



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Chelatory metali w terapiach przeciwnowotworowych

Author: Katarzyna Malarz

Citation style: Malarz, Katarzyna. (2017). Chelatory metali w terapiach przeciwnowotworowych. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

UNIWERSYTET ŚLĄSKI W KATOWICACH

Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii

Instytut Chemii

Zakład Chemii Organicznej

Praca doktorska

**CHELATORY METALI W TERAPIACH
PRZECIWNOWOTWOROWYCH**

Katarzyna Malarz

Promotor:

dr hab. Robert Musioł

Promotor pomocniczy:

dr Anna Mrozek-Wilczkiewicz

Katowice, 2017

Praca finansowana w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki:
"Aktywność przeciwnowotworowa pochodnych tiosemikarbazonu", nr **2014/13/D/NZ7/00322**
(kierownik dr Anna Mrozek-Wilczkiewicz), którego głównym wykonawcą była mgr Katarzyna
Malarz.



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Pragnę podziękować moim Najbliższym za wiarę we mnie, wsparcie,
wrozumiałość, pomoc oraz uśmiech w trudnych chwilach.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i symboli	7
I. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	10
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	11
1. Wstęp	11
2. Terapie celowane	11
3. Rola żelaza i jego metabolizm	14
3.1. Metabolizm żelaza w komórkach nowotworowych	17
3.2. Wpływ chelatacji żelaza na regulację cyklu komórkowego	18
3.3. Gen Ndrgl jako cel molekularny w terapiach przeciwnowotworowych	20
3.7. Efekt chelatacji żelaza na indukcję stresu oksydacyjnego	22
4. Biochemia miedzi w komórkach	23
4.1. Metabolizm miedzi w komórkach nowotworowych	26
4.2. Miedź jako cel terapii przeciwnowotworowych	28
5. Terapie oparte na wywołaniu stresu oksydacyjnego	31
5.1. Stres oksydacyjny a apoptoza	33
6. Chelatory żelaza w terapiach przeciwnowotworowych	36
III. BADANIA WŁASNE	42
1. Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> badanych pochodnych tiosemikarbazonu	42
2. Badanie mechanizmu działania wybranych pochodnych tiosemikarbazonu	69
2.1 Wpływ jonów metali na cytotoksyczność badanych pochodnych TSC	69
2.2 Wpływ TSC na generowanie reaktywnych form tlenu	73
2.3 Wpływ TSC na poziom wewnątrzkomórkowego glutationu w zależności od czasu	76
2.4 Wpływ TSC na ekspresję genów związanych ze stresem oksydacyjnym	79
2.5 Wpływ TSC na ekspresję białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego oraz indukcję apoptozy	82
2.6 Wpływ TSC na regulację cyklu komórkowego	84
2.7 Ocena wpływu TSC na indukcję apoptozy	88
2.8 Interkalacja DNA	90
3. Synergistyczne działanie TSC z fotouczulaczami	94
3.1 Lokalizacja wewnątrzkomórkowa TSC i fotouczulaczy	101

3.2	Wpływ TSC i fotouczulaczy na ekspresję genów związanych z obroną antyoksydacyjną	104
3.3	Wpływ TSC i fotouczulaczy na peroksydację lipidów	107
IV. PODSUMOWANIE		110
V. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA		113
1.	Aparatura	113
2.	Odczynniki wykorzystywane w badaniach <i>in vitro</i>	113
3.	Linie komórkowe	115
4.	Hodowla komórkowa	115
5.	Ocena cytotoksyczności badanych pochodnych	116
6.	Badanie mechanizmu działania wybranych pochodnych tiosemikarbazonu	117
6.1	Ocena cytotoksyczności badanych pochodnych w obecności jonów metali	117
6.2	Wpływ TSC na generowanie reaktywnych form tlenu	117
6.2.1	Zdjęcia mikroskopowe	117
6.2.2	Określenie poziomu generowania reaktywnych form tlenu w zależności od czasu	118
6.3	Wpływ TSC na poziom wewnątrzkomórkowego glutationu w zależności od czasu	118
6.4	Wpływ TSC na ekspresję genów związanych ze stresem oksydacyjnym	119
6.4.1	Projektowanie starterów do reakcji PCR	119
6.4.2	Izolacja całkowitego RNA	120
6.4.3	Odwrotna transkrypcja	121
6.4.4	Reakcja PCR w czasie rzeczywistym	121
6.5	Wpływ TSC na regulację cyklu komórkowego	122
6.6	Ocena wpływu TSC na indukcję apoptozy	122
6.7	Wpływ TSC na ekspresję białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego oraz indukcję apoptozy	123
6.7.1	Izolacja białek	123
6.7.2	Pomiar stężenia białka	123
6.7.3	Elektroforeza SDS-Page	124
6.7.4	Transfer białek na membranę i immunodetekcja	125
6.7.5	Analiza densytometryczna	125
6.8	Interkalacja z DNA	126

7.	Synergia farmakologiczna	126
7.1	Synergistyczne działanie TSC z fotouczulaczami	126
7.2	Lokalizacja wewnątrzkomórkowa TSC i fotouczulaczy	127
7.3	Wpływ TSC i fotouczulaczy na ekspresję genów związanych z obroną antyoksydacyjną	127
7.3.1	Projektowanie starterów do reakcji PCR	127
7.3.2	Izolacja całkowitego RNA	128
7.3.3	Odwrotna transkrypcja	128
7.3.4	Reakcja PCR w czasie rzeczywistym	129
7.4	Wpływ TSC i fotouczulaczy na peroksydację lipidów	129
8.	Analiza statystyczna	130
VI.	LITERATURA	131
VII.	CURRICULUM VITAE	167

Wykaz stosowanych skrótów i symboli

5-FL - 5-fluorouracyl

AIF - czynnik wywołujący apoptozę (ang. *apoptosis inducing factor*)

ATOX1 - białko chaperonowe wiążące jony miedzi (ang. *antioxidant 1 copper chaperone*)

ATP - adenozy-5'-trifosforan (ang. *adenosine triphosphate*)

ATP7A - ATPaza transportująca jony miedzi (ang. *copper-transporting ATPase 1*)

BCR-Abl - gen fuzyjny BCR-Abl1 (ang. *fusion gene BCR-Abl1*)

bFGF - podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*)

BRAF - protoonkogenna kinaza B-raf (ang. *serine/threonine-protein kinase B-raf*)

CAT - katalaza (ang. *catalase*)

CCS - białko chaperonowe wiążące jony miedzi (ang. *copper chaperone for Cu/Zn-superoxide dismutase*)

CDKs - kinazy zależne od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinases*)

CDKIs - inhibitory kinaz zależnych od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitors*)

cDNA - komplementarny DNA (ang. *complementary DNA*)

CI - współczynnik kombinacji (ang. *combination index*)

COX17 - (ang. *cytochrome c oxidase copper chaperone 17*)

CQ - klioquinol (ang. *clioquinol*; *iodochlorhydroxyquin*)

CT-DNA - DNA z grasicy cielęcej (ang. *calf-thymus DNA*);

Ctr - białko transportujące jony miedzi (ang. *copper transporter*)

ddH₂O - podwójnie destylowana woda

DEF - deferazyroks

DEPC - pirowęglań dietylu (ang. *diethyl pyrocarbonate*)

DFO - deferoksamina

DMT1 - transporter dwuwartościowych jonów metali 1 (ang. *divalent metal transporter 1*)

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

DNTB - kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy)

dNTP - trifosforany deoksyrybonukleotydów (ang. *deoxynucleoside triphosphates*)

DOX - doksorubicyna (ang. *doxorubicin*)

DRI - współczynnik redukcji dawki (ang. *Dose-Reduction Index*)

DSF - disulfiram

EDTA - kwas (etylenodiamino)tetraoctowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGFR - receptor czynnika wzrostu naskórka (ang. *epidermal growth factor receptor*)

ER - siateczka endoplazmatyczna (ang. *endoplasmic reticulum*)

GLC - ligaza γ -glutamyl-cysteinowa (ang. *glutamate-cysteine ligase*)

GPx - peroksydaza glutationowa (ang. *glutathione peroxidase*)

GR - reduktaza glutationu (ang. *glutathione reductase*)

GSH - glutation (ang. *glutathione*)

GSSG - disiarczek glutationu (ang. *glutathione disulfide*)

GST - S-transferaza glutationowa (ang. *glutathione S-transferase*)

H₂O₂ - nadtlenuk wodoru

HIF-1 α - czynnik indukowany hipoksją 1-alfa (ang. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*)

HO1 - oksygenaza hemowa 1 (ang. *heme oxygenase 1*)

HRAS - protoonkogen HARS (ang. *Harvey rat sarcoma viral oncogene*)

IC₅₀ - połowa maksymalnego stężenia hamującego (ang. *half maximal inhibitory concentration*)

IL - interleukina (ang. *interleukin*)

IMM - wewnętrzna błona mitochondrialna (ang. *inner mitochondrial membrane*)

IRE - sekwencje reagujące na żelazo (ang. *iron responsive elements*)

IRP - białka regulujące żelazo (ang. *iron regulatory proteins*)

IRN - irynotekan

JNK - kinazy MAPK fosforylujące N-koniec białka Jun (ang. *c-Jun N-terminal kinases*)

LIP - pula labilnego żelaza (ang. *labile iron pool*)

MAPK - kinazy aktywowane mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*)

MBD - domeny wiążące jony metali (ang. *metal-binding domains*)

MDA - malonylodialdehyd

MDR - oporność wielolekowa (ang. *multidrug resistance*)

MnSOD - manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *manganese-dependent superoxide dismutase*)

mRNA - matrycowy RNA (ang. *messenger RNA*)

MT - metalotioneina (ang. *metallothionein*)

NADP/NADPH - fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

Ndr1 - gen regulowany N-myc (ang. *N-myc downstream-regulated gene 1*)

NF- κ B - jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

O₂^{•-} - anionorodnik ponadtlenkowy (ang. *superoxide radical*)

OH[•] - rodnik hydroksylowy (ang. *hydroxyl radical*)

OMM - zewnętrzna błona mitochondrialna (ang. *outer mitochondrial membrane*)

OXL - oksaliplatyna

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

PDGF - płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*)

PDGFR - receptor płytkowopochodnego czynnika wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor receptor*)

PDT - terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy*)

PI3K - 3-kinaza fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*)

PM - błona komórkowa (ang. *plasma membrane*)

PS - fotouczulacz (ang. *photosensitizer*)

PTEN - gen supresorowy PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*)

Rb - białko retinoblastomy (ang. *retinoblastoma protein*)

RNA - kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

ROS - reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

RR - reduktaza rybonukleotydowa (ang. *ribonucleotide reductase*)

SDS-PAGE - elektroforeza w warunkach denaturujących (ang. *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*)

SOD1 - dysmutaza ponadtlenkowa 1 (ang. *superoxide dismutase 1*)

STEAP – metaloreduktaza STEAP (ang. *six transmembrane epithelial antigen of the prostate*)

Tf - transferyna (ang. *transferrin*)

TfR1 - receptor transferyny 1 (ang. *transferrin receptor 1*)

TGF- β - transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor beta*)

TNF- α - czynnik martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor alpha*)

TNG - sieć trans aparatu Golgiego (ang. *trans-Golgi network*)

TP53 - gen kodujący białko p53 (ang. *transcription protein 53*)

Trx - tioredoksyna (ang. *thioredoxin*)

TSC - pochodne tiosemikarbazonu (ang. *thiosemicarbazone*)

UPR - odpowiedź na niepoprawnie zwinięte białko (ang. *unfolded protein response*)

UTR - rejon mRNA niepodlegający translacji (ang. *untranslated region*)

VEGF - czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowej (ang. *vascular endothelial growth factor*)

XIAP - inhibitor apoptozy sprzężony z chromosomem X (ang. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*)

I. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie nowych chelatorów metali o potencjalnych właściwościach antyproliferacyjnych. Następnie, wyjaśnienie molekularnego mechanizmu działania aktywnych pochodnych oraz możliwości ich wykorzystania w terapiach ukierunkowanych na wywołanie stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych. Ponadto, badano możliwość zastosowania pochodnych tiosemikarbazonu (TSC) jako adjuwantów w terapii kombinowanej ze stosowanymi fotouczulaczami w terapii fotodynamicznej (PDT). Zakres pracy obejmował również charakterystykę prawdopodobnego synergistycznego mechanizmu działania pochodnych tiosemikarbazonu z fotouczulaczami z grupy chloryn.

Efektem tych prac jest wzrost zrozumienia mechanizmu działania TSC, który może prowadzić do identyfikacji i charakterystyki nowych celów molekularnych w leczeniu nowotworów dla tej klasy związków. Ponadto, charakterystyka wieloaspektowego działania nowych leków, może prowadzić do rozwoju innowacyjnych wielokierunkowych terapii celowanych. A uzyskane wyniki mogą służyć do opracowania strategii racjonalnego projektowania nowych związków, charakteryzujących się lepszą aktywnością przeciwnowotworową oraz selektywnością.

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Wstęp

Choroby nowotworowe stanowią jeden z najpoważniejszych problemów zdrowotnych na świecie. Zgodnie z raportami Światowej Organizacji Zdrowia (z 2015 roku), corocznie na nowotwory umiera ponad 8,8 miliona ludzi, a ich udział w ogólnej liczbie zgonów szacuje się na ponad 13%. Plasuje to choroby nowotworowe na drugim miejscu, zaraz po chorobach układu krążenia [1]. Najczęściej rozpoznawanymi na świecie są rak płuc (1,82 miliona zachorowań; 13% ogółu), piersi (1,67 milionów; 11,9%) oraz jelita grubego (1,36 milionów; 9,7%). Ponadto, prognozy na najbliższe lata nie są optymistyczne. Przyjmuje się, że w ciągu następnych dwóch dekad liczba nowych przypadków zachorowania na nowotwory wzrośnie o 70% [1,2]. Co więcej, pomimo rozwoju wiedzy oraz opracowania wielu leków, niektóre rodzaje nowotworów nadal pozostają nieuleczalne. Z kolei stosowane metody leczenia, jak chemioterapia charakteryzują się niską efektywnością, a także toksycznością dla szybko dzielących się komórek prawidłowych, co powoduje wiele niekorzystnych efektów ubocznych, w tym takich które mogą zagrażać życiu pacjenta [3]. Dane te pokazują konieczność poszukiwania nowych, skutecznych rozwiązań w walce z nowotworami, w szczególności leków o wysokim profilu selektywności. Co więcej, istotnym elementem tych poszukiwań jest coraz lepsze poznanie mechanizmów działania potencjalnych leków, co jest kluczowe dla stałego ich doskonalenia i stanowi jedno z najważniejszych wyzwań dla współczesnej nauki.

2. Terapie celowane

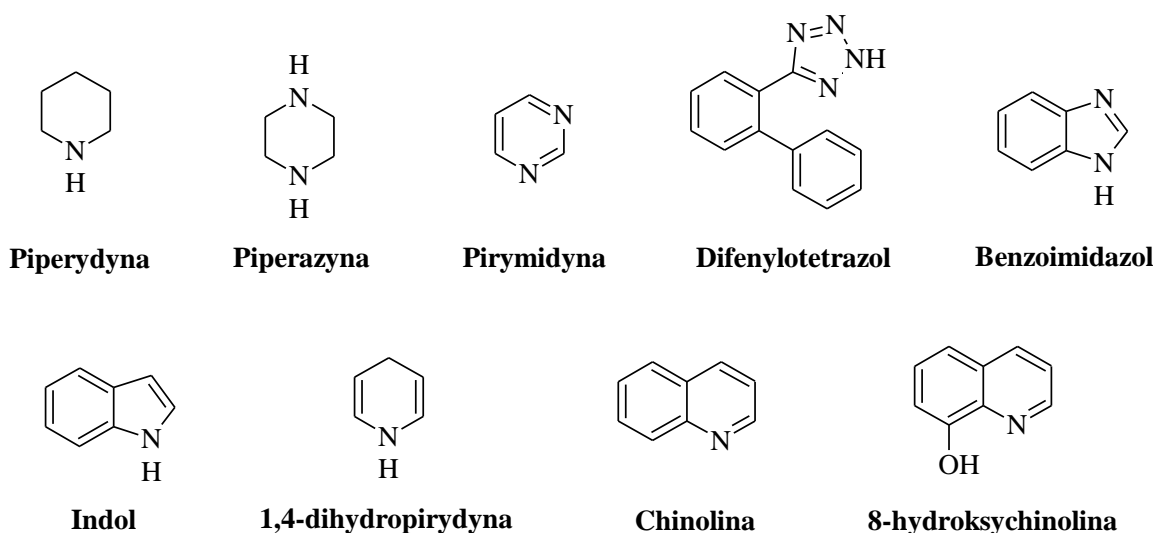
Rozwój chemii medycznej oraz racjonalnego projektowania leków jest podstawą nowoczesnych metod leczenia. Obecnie wiele badań w tej dziedzinie skupia się na mechanizmach transformacji nowotworowej, wskazując szczególną rolę cząsteczek zaangażowanych w progresję cyklu komórkowego oraz ścieżek transdukcji sygnałów [4]. Dzięki temu przez ostatnie półtora dekady opracowano wiele nowych leków skupionych na jednym celu molekularnym. Zaliczamy do nich inhibitory docelowych białek, które koncentrują się na hamowaniu działania kinaz białkowych, deacetylaz histonów czy proteasomów, zapobiegając aktywacji rozregulowanych szlaków sygnalizacyjnych w komórce [5,6]. Drugim rodzajem ukierunkowanego leczenia nowotworów są przeciwciała monoklonalne, których mechanizm działania polega na aktywacji odpowiedzi

immunologicznej (cytotoksyczność zależna od przeciwciał oraz układu dopełniacza), a także na aktywacji apoptozy i zahamowaniu szlaków transdukcji sygnału w wyniku zakłócenia interakcji ligand-receptor lub blokowania określonego receptora dla czynnika wzrostu [7,8]. Początkowo zastosowanie terapii ukierunkowanych na jeden cel molekularny znacząco poprawiło odpowiedź na leczenie. Również w wielu typach nowotworów, które wcześniej nie poddawały się łatwo terapii bądź uważane były za nieuleczalne. Przykładami mogą być inhibitory kinazy BRAF dla czerniaka z przerzutami (Vemurafenib), z mutacją BRAF V600E oraz inhibitory receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR) dla niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC) z obecnością mutacji aktywującej domenę kinazy tyrozynowej EGFR (Afatinib) [9,10]. A także, pierwszy wprowadzony do stosowania, małocząsteczkowy inhibitor kinazy tyrozynowej - Imatynib, który zrewolucjonizował leczenie nowotworów złośliwych, uzależnionych od mutacji jednej z kinaz: BCR-Abl, c-KIT lub PDGFR [11]. Jednakże dość szybko zaobserwowano, że istotnym ograniczeniem terapii celowanej jest samoistna lub nabyta oporność. Zjawisko to obejmuje również przeciwciała monoklonalne, na co wskazują ostatnie badania charakteryzujące mechanizmy oporności [12]. Za główne mechanizmy oporności w jednokierunkowych terapiach celowanych uważane są zmiany celu molekularnego poprzez powstałe mutacje, amplifikacje, zmieniony skład intronów w genie kodującym docelowe białko (splicing), aktywację szlaków sygnalizacyjnych poniżej receptora lub zakłócenie mechanizmu ujemnego sprzężenia zwrotnego, a także aktywację alternatywnych, równoległych szlaków sygnalizacyjnych - tzw. mechanizm „bypass” [13–15]. Te problemy, a także szybki wzrost zachorowalności, wymusiły opracowanie nowych strategii leczenia nowotworów.

Obecnie w stosunku do złożonych i wieloaspektowych chorób nowotworowych coraz więcej uwagi zwraca rozwijane podejście polifarmakologii. Założeniem jest projektowanie leków, które oddziałują z wieloma celami, przez co posiadają lepszy profil skuteczności, w odniesieniu do leków jednocelowych, przy zachowaniu selektywności [16]. Co więcej, podejście polifarmakologiczne pozwala na odkrycie nieznanych celów molekularnych dla istniejących leków. Podejście takie wymaga systematycznej integracji danych pochodzących z różnych dziedzin, w tym modelowania molekularnego, syntezy, testów farmakologicznych *in vitro* oraz *in vivo*, w tym także badań klinicznych [17,18]. W rzeczywistości, okazuje się, że większość środków spełnia ten warunek, bowiem oprócz zasadniczego działania terapeutycznego posiadają one jedno lub więcej działań drugorzędowych, które są wywoływane przez inne niż główny cele molekularne. Jednakże, w przeciwieństwie do leków skupionych na wielokierunkowym działaniu, wywołują one przede wszystkim efekty

niepożądane w docelowych terapiach [17]. W związku z tym, lepsze zrozumienie złożonych interakcji pomiędzy lekami, a ich celami komórkowymi i poznanie w pełni mechanizmu działania, pozwala na uskutecznienie leczenia [19]. Zaletą wielokierunkowych terapii celowanych jest również przezwyciężenie problemu oporności na lek [16,20].

Biorąc pod uwagę korzyści wielokierunkowych terapii celowanych, coraz większe znaczenie ma umiejętność racjonalnego projektowania leków o pożądanym profilu aktywności biologicznej. To zadanie, stanowi wyzwanie i wymaga analizy profilu zależności między strukturą, a aktywnością ligandów oddziałujących z różnymi celami biologicznymi [21]. Przegląd przeprowadzony przez Morphy i in., wykazał, że większość ligandów o wielocelowym działaniu zawiera w swojej strukturze uprzywilejowany motyw strukturalny (ang. *privileged structure*) [22]. Idea struktur uprzywilejowanych zakłada, że pewne układy strukturalne mogą wywoływać pożądane efekty biologiczne częściej niż inne [23]. Może to prowadzić do dywersyfikacji efektów nawet w relatywnie kongenerycznej grupie związków. Od wprowadzenia pojęcia struktur uprzywilejowanych, koncepcja ta była stale rozwijana, co doprowadziło do wskazania kilkunastu fragmentów strukturalnych, które spełniają powyższe kryterium [23–25]. Wiele doniesień literaturowych do tego grona zalicza przede wszystkim struktury (Ryc. 1): benzodiazepiny, piperydyny, difenylotetrazolu, bifenyłu, indolu [26], benzimidazolu [27], dihydropirydyny [28], pirymidyny [29,30], piperazyny [31,32], a ostatnio chinoliny [33,34] oraz 8-hidroksychinoliny [35,36]. Reasumując, ze względu na powinowactwo struktur uprzywilejowanych do różnych celów molekularnych, mogą one stanowić realny punkt wyjścia w poszukiwaniu nowych ligandów o wielotorowym działaniu.



Ryc. 1 Wybrane fragmenty uznane za struktury uprzywilejowane.

3. Rola żelaza i jego metabolizm

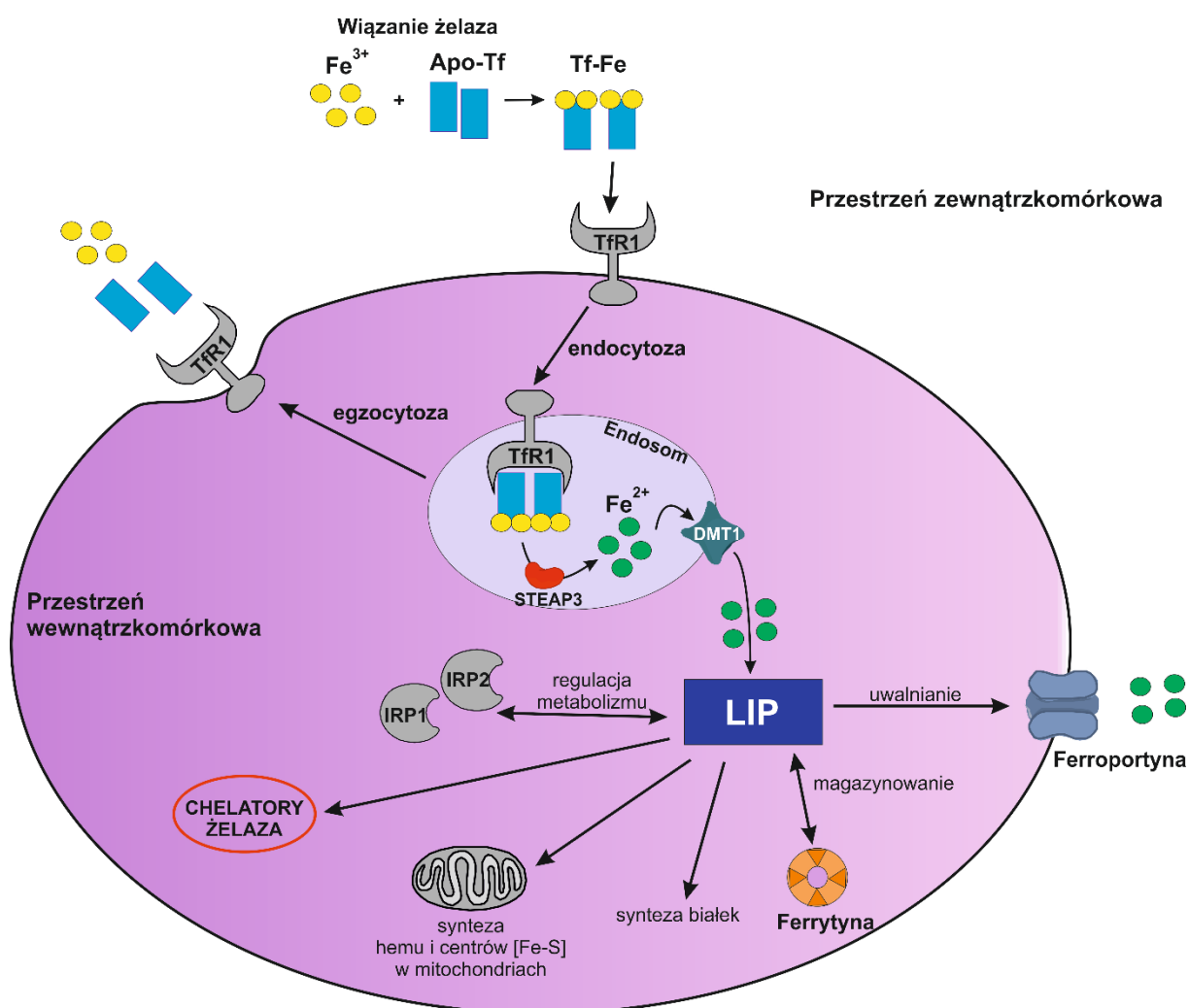
Żelazo jest elementarnym pierwiastkiem, odgrywającym kluczową rolę w regulacji komórkowego metabolizmu oraz prawidłowym funkcjonowaniu organizmu człowieka. Mikroelement ten jest niezbędny w przebiegu wielu procesów prowadzących do wzrostu i proliferacji komórkowej, bowiem poprzez inkorporację do odpowiednich białek warunkuje m.in. oddychanie komórkowe, transport tlenu, wytwarzanie energii – ATP, syntezę hemu i DNA [37,38]. Unikatowy charakter żelaza, określa jego zdolność występowania w układach biologicznych, na dwóch stopniach utlenienia – Fe^{2+} i Fe^{3+} . W związku z tym, może przyjmować i oddawać elektrony, co warunkuje jego dużą reaktywność i wyjaśnia rolę jako kofaktora dla wielu enzymów redoks [39]. Z drugiej strony, podwyższone stężenie tego składnika odżywczego katalizuje powstawanie mutagennych wolnych rodników. Te uszkadzają białka, lipidy, a także DNA, poprzez modyfikacje par zasad lub podwójne pęknięcia nici, co może również prowadzić do aktywacji onkogenów [40]. Natomiast niedobór żelaza wywołuje różnego rodzaju zaburzenia, które mogą skutkować zatrzymaniem cyklu komórkowego [41]. Wobec tych konsekwencji, stężenie żelaza w organizmie jest ściśle kontrolowane [42].

Wchłanianie żelaza z pokarmu następuje głównie w dwunastnicy i górnej części jelita cienkiego, za pośrednictwem enterocytów. Komórki te mogą absorbować żelazo występujące w dwóch formach, jako żelazo niehemowe (nieorganiczne) oraz żelazo w formie skompleksowanej z hemem [43]. Warto zauważyć, że żelazo hemowe ze źródeł mięsnych jest łatwiej przyswajane przez organizm, jednakże mechanizmy za to odpowiedzialne nie są do końca poznane. Uważa się, że za wychwyt żelaza hemowego odpowiedzialna jest endocytoza kierowana receptorami [44]. Początkowo zidentyfikowano białko HCP1 (ang. *heme-carrier protein 1*) jako potencjalny transporter hemu o niskim powinowactwie [45]. Jednak kolejne badania w tym obszarze wykazały, że białko to funkcjonuje jako transporter o wysokim powinowactwie do kwasu foliowego - PCFT/HPC1 (ang. *proton-coupled folate transporter*) [46]. Wobec tego, białka pośredniczące w procesie wchłaniania hemu do enterocytów nie są jednoznacznie scharakteryzowane. Wewnątrz tych komórek, hem ulega degradacji do biliwerdyny i Fe^{2+} pod wpływem aktywności oksydazy hemowej 1 - HO1 (ang. *oxygenase heme 1*), a następnie jony żelaza są transportowane przez ferroportynę [47]. Z kolei, żelazo nieorganiczne jest transportowane przez apikalną błonę komórkową enterocytu za pośrednictwem transportera metali dwuwartościowych DMT1 (ang. *divalent metal transporter 1*) [48]. Jak wskazuje nazwa białka, może ono transportować metale znajdujące się tylko na II stopniu utlenienia. W związku, z występowaniem żelaza w diecie, głównie w formie utlenionej

- Fe^{3+} , konieczna jest redukcja przed absorpcją. Za ten proces odpowiada oksydoreduktaza występująca w błonie śluzowej dwunastnicy - cytochrom b_{561} , która wykorzystuje do redukcji jonów żelaza wewnątrzkomórkowy askorbinian jako donor elektronów [49]. Po konwersji, zredukowane żelazo w enterocytach jest wiązane przez ferrytynę, a jego nadmiar jest przekazywany do krwi za pośrednictwem transportera - ferroportyny, który współdziała z hefestyną, katalizującą ponowne utlenienie żelaza [50]. Dzięki temu, możliwe jest związanie w postaci kompleksu, dwóch atomów Fe^{3+} z transferyną (Tf), odpowiedzialną za transport żelaza do komórek. Na powierzchni błony komórkowej znajdują się receptory TfR1 (ang. *transferrin receptor 1*), które przyjmują dwie cząsteczki Tf-Fe, a następnie przekazują do wnętrza komórki na drodze endocytozy [51]. W endosomie pod wpływem niskiego pH, jony żelaza Fe^{3+} są uwalniane z kompleksu, a następnie redukowane przez metaloreduktazę STEAP3 lub za pomocą askorbinianu [52,53]. W końcowym etapie jony żelaza Fe^{2+} są transportowane przez DMT1 do cytozolu, gdzie zasilają pulę labilnego żelaza (LIP, ang. *labile iron pool*) [54]. Występują w niej obie formy jonowe żelaza, które są związane z różnymi niskocząsteczkowymi ligandami, takimi jak cytryniany, fosforany, polipeptydy, nukleotydy czy cukry [55]. Żelazo z cytozolowej puli może być wykorzystywane do regulacji metabolizmu żelaza w komórce, biosyntezy hemu oraz centrów [Fe-S], stanowi także źródło dla wiązania przez ferrytynę i magazynowania w formie nietoksycznej [39,54]. Co więcej, warto zauważyć, że jony żelaza znajdujące się w LIP stanowią główny zasób dla chelatorów żelaza, które po związaniu z Fe mogą tworzyć redoks aktywne kompleksy [56]. Z kolei uwalnianie tego pierwiastka z LIP do przestrzeni zewnątrzkomórkowej odbywa się za pośrednictwem ferroportyny. Ogólny schemat wewnątrzkomórkowej regulacji żelaza przedstawiono na Ryc. 2.

Zarówno metabolizm żelaza, jak i utrzymanie homeostazy wymaga precyzyjnych mechanizmów kontrolujących procesy wychwytu, przechowywania i uwalniania tego pierwiastka w komórkach. Głównymi cząsteczkami zaangażowanymi w ten proces są białka IRP1 i IRP2 (ang. *iron regulatory protein*). Wiążą się one z elementami reagującymi na żelazo IREs (ang. *iron responsive elements*), które występują w niepodlegających translacji regionach UTR (ang. *untranslated region*) 5' lub 3' kilku mRNA kodujących białka m.in., ferrytynę, receptor transferyny czy ferroportynę [57,58]. Niedobór żelaza w komórkach powoduje, że białka regulatorowe IRP wiążą się z sekwencjami IREs w 5' UTR mRNA ferrytyny i ferroportyny blokując ich translację oraz z sekwencjami w 3' UTR mRNA TfR1, co prowadzi do stabilizacji mRNA, a także dodatkowej translacji białka i wynikającego z tego zwiększenia wychwytu żelaza zależnego od TfR1. Z kolei w przypadku nadmiaru żelaza w komórkach,

następuje sytuacja odwrotna, IRP nie wiążą się z IREs, zwiększając syntezę ferrytyny i ferroportyny, a tym samym kierując mRNA TfR1 na drogę degradacji [41]. Warto wspomnieć, że innym mechanizmem regulującym wewnątrzkomórkowy poziom żelaza jest hepcydyna, posiadająca zdolność wiązania i kontrolowania ekspresji ferroportyny w enterocytach, hepatocytach oraz makrofagach [59]. Interesującym faktem jest możliwość zwiększenia ekspresji hepcydyny poprzez aktywację białka p53, co może umożliwić deprywację żelaza z komórek nowotworowych [60]. Co więcej, żelazo wpływa na aktywność białka p53 w zatrzymaniu cyklu komórkowego, podczas gdy białko to może również regulować aktywność IRP oraz ekspresję ferrytyny i transferyny, prowadząc do zmniejszenia dostępności tego pierwiastka [61].



Ryc. 2 Wewnątrzkomórkowa regulacja żelaza [39,62], zmodyfikowano.

3.1. Metabolizm żelaza w komórkach nowotworowych

Zaburzenie homeostazy żelaza można rozpatrywać w różnych aspektach. Główny z nich dotyczy komórek nowotworowych, które charakteryzują się zmienionym metabolizmem żelaza, w odróżnieniu od komórek prawidłowych. Wynika to z faktu, ich zwiększonego zapotrzebowania na ten pierwiastek, kluczowy dla szybkiego wzrostu i namnażania [41]. Zwiększonym wymaganiom dla syntezy DNA towarzyszy wzrost ekspresji reduktazy rybonukleotydowej (RR) zależnej od żelaza [63]. Wobec tego, komórki nowotworowe realizują zwiększoną podaż tego pierwiastka poprzez wysoką ekspresję transferryny, a także większą liczbę receptorów transferyny na powierzchni komórek [64]. Szczególnie, nadekspresja TfR1 jest obserwowana w nowotworach pęcherza moczowego, piersi, płuc, białaczki, czy glejakach [51]. W konsekwencji, stosowanie w terapiach przeciwciał skierowanych na TfR1 hamuje wzrost guza, a także jak wykazano usprawnia efektywność dostarczania leków przeciwnowotworowych do komórek [65,66]. Co więcej, istnieje wiele doniesień pokazujących korelację pomiędzy nadekspresją TfR1, a stadium zaawansowania guza [67]. Liczne badania wskazują również na wysoką ekspresję metaloreduktaz STEAP, które pośredniczą w endosomalnej redukcji jonów żelaza, w raku pęcherza moczowego, piersi, okrężnicy, płuc i prostaty [68].

Kolejnymi czynnikami odgrywającym istotną rolę w zaburzeniu metabolizmu żelaza są proto-onkogeny c-Myc z rodziny Myc (ang. *avian myelocytomatosis viral oncogene*). Ich zwiększona ekspresja została zidentyfikowana na szerokim panelu linii komórkowych [69]. Jak wykazano, w komórkach B, c-Myc może indukować ekspresję elementów IRP2, jednocześnie hamując ferrytynę [70]. Co więcej w raku okrężnicy wykazano wpływ c-Myc na ekspresję TfR1 oraz DMT [71]. Innym onkogenem obniżającym ekspresję ferrytyny jest HRAS (ang. *Harvey rat sarcoma viral oncogene*). Ponadto jego aktywacja powoduje wzrost stężenia żelaza w cytozolowej puli labilnego żelaza, co skutkuje zwiększoną proliferacją komórkową [72]. Z drugiej strony, zwiększony poziom ekspresji ferrytyny obserwowano w komórkach raka piersi czy gruczolakoraku przełyku [67,73]. Co więcej, wysokie stężenie mRNA ferrytyny w tkankach u chorych na raka piersi korelowało z obecnością przerzutów. Wobec tego, ocena ilościowa ekspresji mRNA ferrytyny, a także TfR1 może być prowadzona w celu określenia rokowania, a także efektu zastosowanego leczenia u pacjentów z rakiem piersi [74]. Co ciekawe, jak pokazują ostatnie badania poprzez obniżenie poziomu ferrytyny można zwiększyć wrażliwość komórek raka piersi na stosowane leczenie przy wykorzystaniu takich chemioterapeutyków jak, doksorubicyna czy karmustyna [73]. Przytoczone dane literaturowe,

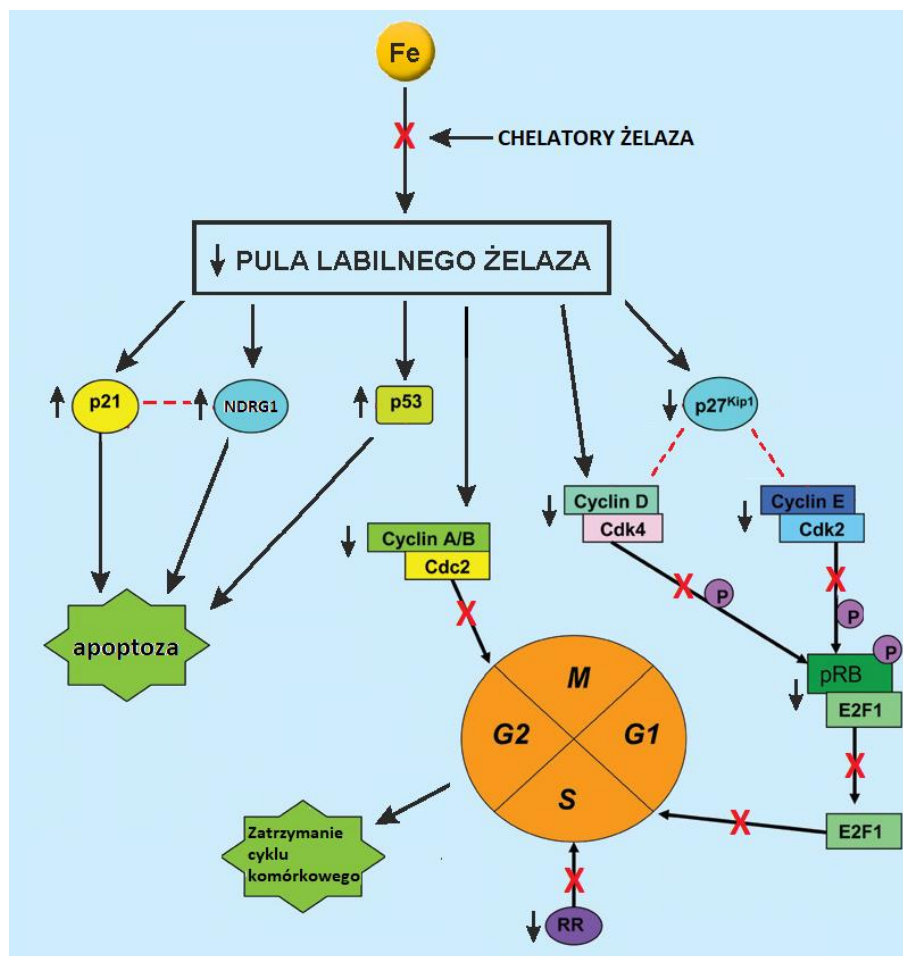
pokazują istotną rolę zmian poziomu stężenia ferrytyny na postępujący proces kancerogenezy. Jednakże podstawowe mechanizmy molekularne odpowiedzialne za wpływ stężenia ferrytyny na ten proces pozostają w dużej mierze nieznane [74].

Podsumowując, zdolność do zmiany metabolizmu żelaza w komórkach nowotworowych, a także wpływ na szlaki sygnalizacji komórkowej, wydają się być potencjalnym celem terapii przeciwnowotworowych, wykorzystujących ligandy wiążące żelazo. Wobec tego, w ciągu ostatnich kilkunastu lat wyraźnie zaznaczył się trend w projektowaniu nowej klasy silnych środków antynowotworowych, jakimi są chelatory żelaza [75]. Istotnymi są różnice w poziomie, a także regulacji żelaza pomiędzy komórkami zmienionymi chorobowo, a prawidłowymi, co sprawia, że otwierają się możliwości projektowania selektywnych i bezpiecznych leków.

3.2. Wpływ chelatacji żelaza na regulację cyklu komórkowego

Deprywacja wewnątrzkomórkowego żelaza poprzez chelatację, może wywoływać z terapeutycznego punktu widzenia wiele korzystnych efektów. W pierwszej kolejności, chelatory żelaza mogą być wykorzystane jako inhibitory enzymu reduktazy rybonukleotydowej, która warunkuje syntezę DNA, poprzez redukcję rybonukleotydów do ich odpowiednich deoksyrybonukleotydów (dNTP). Enzym ten składa się z dwóch podjednostek białkowych - R1 i R2, przy czym aktywność katalityczną RR warunkuje podjednostka R2, która zawiera dwa atomy żelaza oraz wolny rodnik tyrozylowy. Jego destabilizacja, poprzez reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), skutkuje zahamowaniem katalitycznej zdolności enzymu [63,76]. Takie działanie, może prowadzić do zahamowania procesu syntezy DNA, a co za tym idzie proliferacji komórkowej. Natomiast, w efekcie końcowym może skutkować również wywołaniem śmierci komórkowej poprzez apoptozę. W tym miejscu, należy podkreślić, że dzięki wysokiej aktywności RR w komórkach nowotworowych jest ona niezwykle atrakcyjnym celem molekularnym dla nowych terapii antynowotworowych. Pierwszym obiecującym inhibitorem RR należącym do klasy chelatorów żelaza jest Triapina (pochodna 3-aminopirydino-karboksyaldehydu; 3-AP). Jak wykazano w wielu badaniach wstępnych, związek działa hamująco na proliferację i wzrost wielu typów nowotworów (dokładny mechanizm działania opisano w rozdziale 6). Obecnie, Triapina pomyślnie ukończyła II etap badań klinicznych i ma szansę stać się nowym atrakcyjnym lekiem ze wskazaniem do stosowania w monoterapii oraz kombinacji z innymi cytostatykami [77].

Ponadto, niski poziom żelaza w komórce wpływa na ekspresję wielu białek biorących udział w progresji cyklu komórkowego. Najważniejszymi regulatorami cyklu komórkowego są cykliny, kinazy zależne od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinases*, CDK), białko p53, białko retinoblastomy (ang. *retinoblastoma protein*, Rb) oraz inhibitory kinaz zależnych od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitors*, CDKI), takie jak p21^{CIP/WAF1} [63]. Kinazy wykazują swoją aktywność tylko we współdziałaniu z cyklinami. Zatem, CDK łączą się z cyklinami, tworząc heterodimery, które bezpośrednio regulują progresję cyklu komórkowego. Z kolei, aktywność tych kompleksów zależy od inhibitorów kinaz zależnych od cyklin [78]. Progresja cyklu komórkowego w fazie G1, a następnie przejście do fazy S jest częściowo kontrolowane przez aktywację kompleksów cyklina D1/cdk4 i cyklina E/cdk2 [79]. Co więcej aktywność cykliny D1 jest związana z białkiem p21^{CIP/WAF1}, które w odpowiedzi na deprywację żelaza w komórkach, może indukować dwojaki efekt na regulację cyklu komórkowego. Wobec tego, zmniejszenie ekspresji białka p21^{CIP/WAF1} może prowadzić do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1/S, gdyż stabilizuje ono kompleks cyklina D1/cdk4 [80,81]. Jednak, z drugiej strony, chelatory żelaza poprzez wiązanie żelaza z przestrzeni wewnątrzkomórkowej mogą zwiększać ekspresję białka p21^{CIP/WAF1}, co w konsekwencji uruchamia szlaki sygnalizacyjne, kierujące komórki na drogę apoptozy [79,82]. Faza S w cyklu komórkowym jest regulowana przez cyklinę A i odpowiadające jej cdk. Z kolei białko cdc2, będące podjednostką katalityczną heterodimeru z cykliną B, jest odpowiedzialne za przejście do fazy G2/M cyklu komórkowego [63,79]. Co ciekawe, deprywacja żelaza powoduje głównie redukcję cyklin D1, D2, D3 oraz hamuje fosforylację białka retinoblastomy, podczas gdy ekspresja cykliny A i B jest zredukowana w mniejszym stopniu [83]. Wobec tego, może to wskazywać na większe zaangażowanie chelatorów w zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1/S niż G2/M [84,85]. Jednym z krytycznych regulatorów cyklu komórkowego, jest białko p53, które uczestniczy w punktach kontrolnych G1/S i G2/M [81]. Znane inaczej jako „strażnik genomu”, jest zaangażowane w reakcję na deprywację żelaza, stres komórkowy, uszkodzenie DNA poprzez aktywację transkrypcji wielu genów zaangażowanych w zatrzymanie cyklu komórkowego, stymulację naprawy DNA lub apoptozę, jeśli uszkodzenia są nieodwracalne [86,87]. Jak już wspomniano, białko p53 może również oddziaływać na ekspresję białek zaangażowanych w regulację metabolizmu żelaza - IRP, ferrytynę oraz transferynę, co prowadzi do zmniejszenia dostępności tego pierwiastka w cytozolowej puli labilnego żelaza.

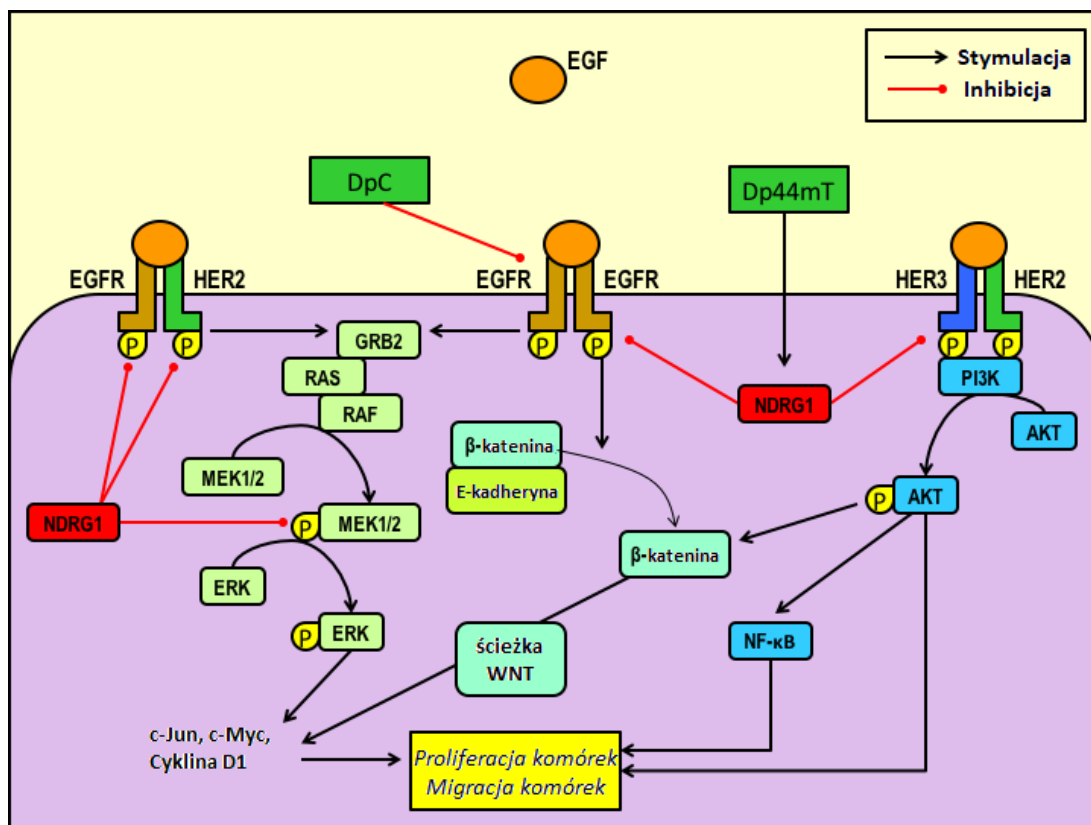


Ryc. 3 Efekt chelatacji żelaza na ekspresję wielu cząsteczek pośredniczących w cyklu komórkowym oraz indukcji apoptozy [63,79], zmodyfikowano.

3.3. Gen NdrG1 jako cel molekularny w terapiach przeciwnowotworowych

Żelazo, poza wpływem na ekspresję białek zaangażowanych w progresję cyklu komórkowego, może również modulować ekspresję genu supresora przerzutowego, mianowicie genu 1 regulowanego N-myc (ang. *N-myc downstream-regulated gene 1*, NdrG1). Jak wskazują ostatnie badania gen ten jest dobrze znanym inhibitorem przerzutów w wielu typach nowotworów, takich jak rak okrężnicy, prostaty, piersi, trzustki, mózgu oraz neuroblastomy [88–92]. Ponadto, NdrG1 odgrywa fundamentalną rolę w embriogenezie i rozwoju, wzroście i różnicowaniu komórek, biosyntezie lipidów, a przede wszystkim odpowiedzi na stres. Co więcej, oprócz jego podstawowej roli jako supresora przerzutowego, NdrG1 może wpływać na inne etapy kancerogenezy, a mianowicie angiogenezę i pierwotny wzrost guza [88].

Wobec tego, gen ten może być niezwykle istotnym celem molekularnym, ze względu na zdolność do regulacji i oddziaływania z wieloma ścieżkami sygnalizacyjnymi w komórkach nowotworowych. W ostatnich badaniach udowodniono, że NdrG1 wyraźnie hamuje aktywację wielu receptorowych kinaz tyrozynowych, w tym EGFR oraz jego rodzin, HER2 i HER3, z których wszystkie w normalnych warunkach, aktywują wiele szlaków promujących proliferację, migrację komórek oraz przerzuty, takich jak, szlak kinazy białkowej AKT, TGF- β , ROCK1/pMLC2, Ras, WNT (Ryc. 4) [93].



Ryc. 4 Wpływ tiosemikarbazonów - Dp44mT i DpC na ścieżki sygnałowe związane z receptorami EGFR, HER2 i HER3 za pośrednictwem indukcji ekspresji genu NdrG1 [93], zmodyfikowano.

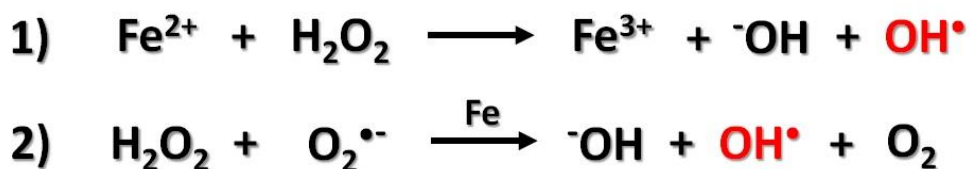
Ponadto, NdrG1 reguluje inhibitor CDK - p21^{CIP/WAF1}, który jak wcześniej wspomniano, może pośredniczyć w działaniu przeciwnowotworowym [94]. Co więcej, wiele doniesień wskazuje na istotną rolę NdrG1 w regulacji wielu kluczowych szlaków sygnalizacyjnych, takich jak szlak PI3K/AKT, MAPK i TGF- β , odpowiadających za przemianę komórek nabłonkowych na mezenchymalne (EMT) oraz przerzuty. Zahamowanie tych procesów jest możliwe poprzez wykorzystanie zdolności tiosemikarbazonów (TSC), takich jak Dp44mT lub DpC, do znacznego zwiększenia ekspresji NdrG1 [92,95,96]. Ponadto, regulacja tego genu za pomocą

chelatorów żelaza związana jest z wyczerpaniem zasobów wewnątrzkomórkowego żelaza, a także indukcją mechanizmów zależnych i niezależnych od czynnika indukowanego hipoksją 1 (ang. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*; HIF-1α) [97]. Warto zauważyć, że skuteczność antyproliferacyjna chelatorów, wynika z ich wpływu na różne podstawowe cele molekularne, oprócz Ndrgl, również na p21^{CIP/WAF1}, cyklinę D1 oraz enzym RR, z których wszystkie są zaangażowane w regulowanie proliferacji komórkowej [81,82].

3.7. Efekt chelatacji żelaza na indukcję stresu oksydacyjnego

Wiele dotychczasowych doniesień, wykazało, że za biologicznym efektem wywołanym działaniem chelatorów żelaza, nie stoi tylko zdolność do wiązania żelaza, która skutkuje zmniejszeniem jego dostępności w zasobach LIP. Istotnym faktem, jest także możliwość tworzenia przez chelatory redoks-aktywnych kompleksów z żelazem, które mogą generować reaktywne formy tlenu [56,98]. Fundamentalną rolę w tym procesie stanowi odpowiedni atom donorowy w strukturze chelatora, który warunkuje zdolność całego kompleksu do uczestnictwa w reakcjach redoks, a także określa jego profil cytotoksyczny. Jak wykazały badania, występowanie „miękkich” atomów donorowych, jak azot czy siarka, determinuje tworzenie aktywnych kompleksów z jonami żelaza, które charakteryzują się silną aktywnością przeciwnowotworową. W przeciwieństwie do związków zawierających w swojej strukturze „twarde” atomy donorowe jak tlen, które prowadzą do tworzenia nieaktywnych redoksowo kompleksów, poprzez zablokowanie sfery koordynacji [99,100].

Reaktywne formy tlenu, powstają za sprawą związania żelaza w jego labilnej puli, gdzie występują obie formy jonowe tego pierwiastka - Fe²⁺ oraz Fe³⁺, które katalizują reakcje Fentona i Haber-Weissa (Ryc. 5).



Ryc. 5 Generowanie rodnika hydroksylowego w reakcjach Fentona (1) i Haber-Weissa (2) [101].

W obu tych reakcjach, zarówno nadtlenek wodoru (H_2O_2), jak i anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$) w obecności metalu na II stopniu utlenienia tworzy rodnik hydroksylowy (OH^{\bullet}). Silnie elektrofilowy charakter OH^{\bullet} sprawia, że jest on jedną z najbardziej reaktywnych cząsteczek w układach biologicznych. Wobec tego, jest on odpowiedzialny za powstawanie większości oksydacyjnych uszkodzeń cząsteczek DNA, co więcej może indukować uszkodzenia białek, a także lipidów [101,102]. Oksydacyjne uszkodzenia DNA obejmują utlenianie puryn i pirymidyn, co w konsekwencji prowadzi do pojedynczych modyfikacji zasad, całych nukleotydów oraz jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA [103]. Najczęściej modyfikowana przez rodnik hydroksylowy jest guanina, tworząc 8-hydroksyguaninę (8-OH-G) [104]. Wiele danych literaturowych wskazuje na bezpośredni związek poziomu 8-OH-G z transformacją nowotworową guzów, a także silne zaangażowanie tego produktu utlenienia w proces kancerogenezy [105,106].

Jednakże, nadmiar generowanych reaktywnych form tlenu może wpływać na regulację i ekspresję wielu genów, a to w konsekwencji prowadzi do wyzwolenia apoptozy [107]. Warto zauważyć, że w procesach odpowiedzi na stres komórkowy, takich jak hipoksja, uszkodzenia DNA, a także deprywacja żelaza lub wapnia, istotną rolę odgrywa gen *Ndr1* [108]. Takie działanie, pozwala na terapeutyczne wykorzystanie ROS w terapiach przeciwnowotworowych. Co więcej, dokładniejsze zrozumienie wszystkich sieci oddziaływań między cząsteczkami zależnymi od stężenia wewnątrzkomórkowego żelaza może być bardzo ważnym celem współczesnej chemioterapii przeciwnowotworowej.

4. Biochemia miedzi w komórkach

Podobnie jak żelazo, miedź jest niezbędnym mikroelementem, wymaganym w prawidłowym przebiegu wielu procesów biologicznych. Pierwiastek ten, jest kofaktorem wielu enzymów pośredniczących w transporcie tlenu, detoksykacji reaktywnych form tlenu, sygnalizacji komórkowej, a także w mitochondrialnym metabolizmie żelaza [109–111]. Miedź, w układach biologicznych może występować na dwóch stopniach utlenienia - Cu^+ oraz Cu^{2+} . Wobec tego, będąc donorem i akceptorem elektronów, wykazuje silne właściwości redoks, które tym samym warunkują jej udział jako kofaktora w wielu reakcjach oksyredukcyjnych [112]. Jednak pomimo swojej znaczącej roli dla zachowania homeostazy, miedź z uwagi na wysoką reaktywność, może powodować toksyczność. Miedź może również katalizować wytwarzanie wolnych rodników w reakcjach Fentona i Haber-Weissa, co skutkuje uszkodzeniami lipidów,

białek i DNA [113]. W konsekwencji, w większości miedź jest związana z białkami lub magazynowana, praktycznie nie występując w stanie wolnym w cytozolu [111]. Podobnie jak w przypadku innych metali przejściowych, jej metabolizm jest ściśle kontrolowany przez dobrze zorganizowany system, obejmujący wchłanianie, transport i wydalanie.

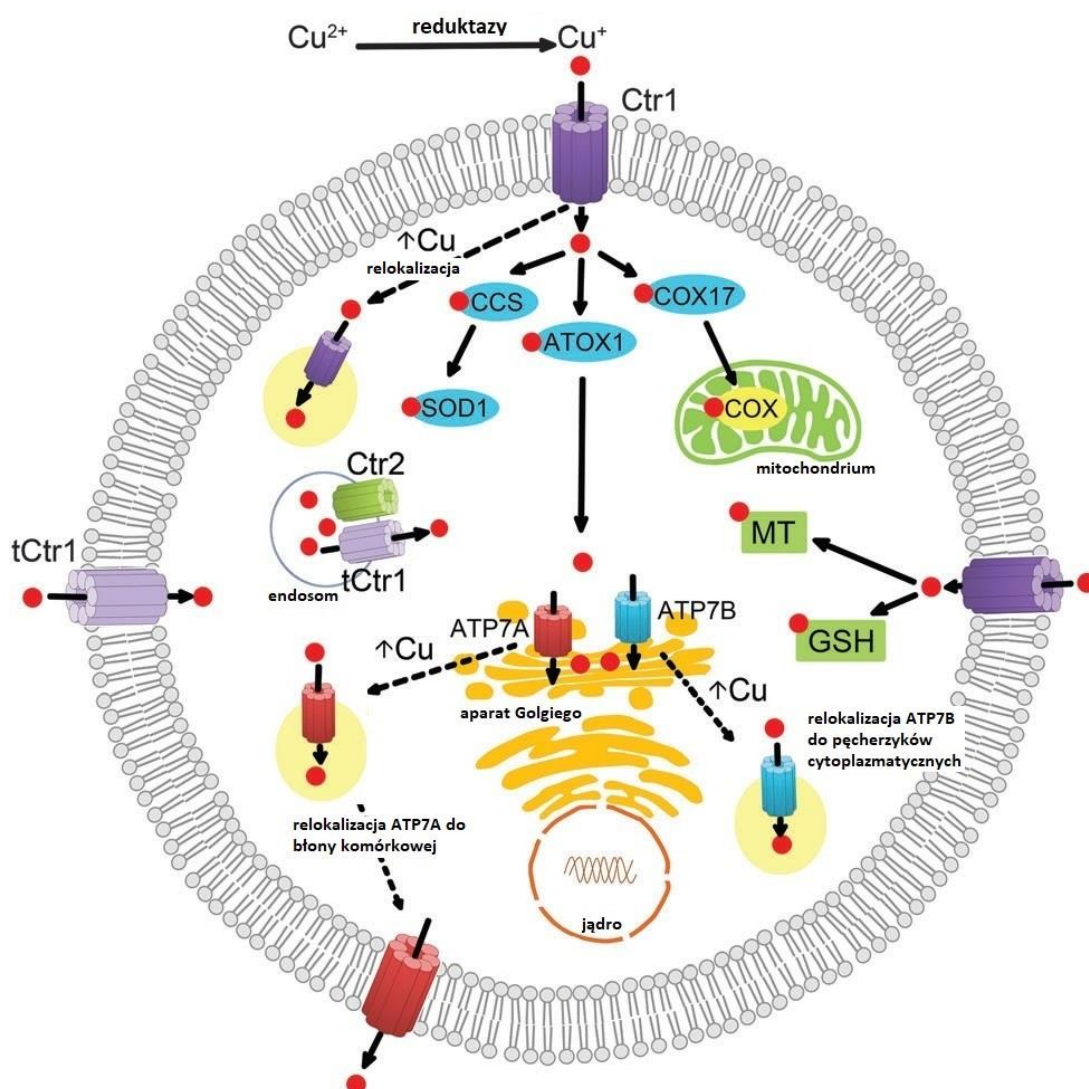
Miedź jest w dużym stopniu wchłaniana w jelicie cienkim oraz dwunastnicy za sprawą złożonego procesu, zależnego od wielu czynników. Jednak, dokładne mechanizmy regulujące ten proces nie są do końca poznane [114]. Ostatnie badania wskazują, że absorpcja miedzi wzdłuż rąbka szczotkowego mikrokosmków zachodzi głównie przy udziale nośnika niezależnego od ATP - transportera miedzi 1 (ang. *copper transporter 1*; Ctr1) [115]. Co więcej, w niektórych doniesieniach wykazano, że za transport tego pierwiastka odpowiadają również białka DMT1 oraz transporter miedzi 2 (ang. *copper transporter 2*; Ctr2) [116,117]. Warto zauważyć, że w diecie miedź występuje jako Cu^{2+} , natomiast Ctr1 jest białkiem o wysokim powinowactwie do zredukowanej formy miedzi Cu^{+} [118]. Zatem, konieczna jest redukcja jonów miedzi, w której mogą pośredniczyć metaloreduktazy z rodziny STEAP, takie jak STEAP3 i STEAP4 lub askorbinian [115,119]. Co ciekawe, innym potencjalnym reduktorem jonów miedzi może być cytochrom b_{561} , który jak wcześniej wspomniano wykazuje aktywność feroreduktazy [68]. Następnie zredukowana miedź jest transportowana z enterocytów do krwioobiegu przez ATPazy typu P - ATP7A [120]. Należy w tym miejscu wspomnieć, że w obiegu pierwiastek ten występuje w formie utlenionej - Cu^{2+} [121]. Ponieważ w wolnej postaci jest silnie toksyczny, musi być związany z białkami osocza - ceruloplazminą, albuminą oraz w mniejszym stopniu z transkupreina, które wykazują do miedzi (II) wysokie powinowactwo [120,122]. Głównym narządem odpowiedzialnym za regulację stanu miedzi w organizmie jest wątroba. Wobec tego, zachodzą tam mechanizmy kontrolujące dystrybucję tego pierwiastka do surowicy oraz tkanek, a także wydalanie jej nadmiaru do żółci [123]. Za transport miedzi do komórek, odpowiedzialne są wspomniane już białka osocza, które dostarczają Cu^{2+} do transporterów Ctr1 zlokalizowanych w błonie komórkowej. Przed wchłonięciem miedzi do komórki, znów następuje jej redukcja do jonów Cu^{+} poprzez oksydoreduktazy znajdujące się na powierzchni komórki [124]. W cytozolu, jony miedzi Cu^{+} są natychmiast związane z białkami chaperonowymi (tzw. białka opiekuńcze) [125]. Zadaniem chaperonów jest wewnątrzkomórkowy transport tych jonów do odpowiednich enzymów. Do tej pory, w komórkach ssaków zidentyfikowano trzy główne rodzaje tych białek: COX17 (ang. *cytochrome c oxidase copper chaperone 17*), ATOX1 (ang. *antioxidant 1 copper chaperone*) oraz CCS (ang. *copper chaperone for Cu/Zn-superoxide dismutase*). Odpowiadają one

odpowiednio za dostarczenie miedzi do oksydazy cytochromu c w mitochondrium, transporterów ATP7A i 7B w sieci trans aparatu Golgiego (ang. *trans-Golgi network*; TNG) oraz dysmutazy ponadtlenkowej SOD1 [124,126]. Co więcej, podobną funkcję pełnią dwa komórkowe antyoksydanty - glutation (ang. *glutathione*; GSH) oraz metalotioneina (MT), które poprzez związanie jonów Cu^+ zapobiegają generowaniu reaktywnych form tlenu [127]. Co ciekawe, w przypadku braku białek CCS, glutation może również pełnić rolę transportera miedzi do SOD1 [128]. W ostatnich latach, zaproponowano nawet model, w którym to miedź miałaby być transportowana wzdłuż gradientu powinowactwa, od glutationu do białek chaperonowych, a w końcowym etapie do białek, które wykazują najwyższe powinowactwo do jonów miedzi [129,130].

Kluczowymi regulatorami transportu oraz metabolizmu miedzi w komórce są transportery ATP7A i ATP7B, występujące w cysternach trans aparatu Golgiego [131]. Transportery te należą do rodziny wysoce konserwatywnych ATPaz typu P. Są one dużymi białkami z ośmioma transbłonowymi domenami oraz z długim cytoplazmatycznym N-końcem zawierającym sześć domen wiążących jony miedzi (MBD) [132]. Zmiana konfiguracji transbłonowej domeny wiążącej ATP podczas zachodzących procesów fosforylacji i defosforylacji, odpowiada za translokację miedzi przez błony lipidowe, co jest ważne z punktu jej dalszej dystrybucji w komórce, jak i również usunięcia nadmiaru [131,133]. Zarówno ekspresja mRNA, jak i białek ATP7A i ATP7B jest zależna od poziomu stężenia miedzi w komórce [134]. W związku z tym, w przypadku zwiększonego stężenia jonów Cu^+ w środowisku wewnątrzkomórkowym następuje internalizacja transporterów ATP7A do błony komórkowej, a także ATP7B do pęcherzyków klatrynowych znajdujących się w cytoplazmie. W efekcie, takie działanie prowadzi do wydalenia miedzi z komórki [133]. Podobna sytuacja następuje w przypadku transporterów Ctr1, które są przemieszczane do pęcherzyków cytoplazmatycznych [124]. Co więcej, jak wykazały ostatnie badania, transportery miedzi Ctr2 mogą regulować funkcję Ctr1. Albowiem, brak białka Ctr2 indukuje akumulację miedzi w endosomach, podczas gdy jego obecność wpływa na powstanie skróconej formy białka Ctr1 (ang. *truncated Ctr1*; tCtr1), która jest pozbawiona ektodomeny wiążącej metal. W efekcie, może to skutkować zmniejszeniem wewnątrzkomórkowej akumulacji miedzi [135].

Ostatnie doniesienia literaturowe ujawniły, także powiązanie procesów regulacji homeostazy i metabolizmu miedzi z białkiem XIAP (ang. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*) z rodziny inhibitorów apoptozy [136]. Jak wykazano, białko to promuje ubikwitynację i degradację COMMD1 (ang. *Copper Metabolism gene MURR1 domain containing 1*), które

z kolei stymuluje wypływ miedzi z komórki [137]. Ogólny schemat wewnątrzkomórkowej regulacji miedzi, uwzględniający jej wychwyt, dystrybucję oraz usuwanie przedstawiono na Ryc. 6.



Ryc. 6 Wewnątrzkomórkowa regulacja miedzi [138], zmodyfikowano.

4.1. Metabolizm miedzi w komórkach nowotworowych

Znaczenie miedzi w rozwoju chorób nowotworowych jest przedmiotem badań od dziesięcioleci [138]. Jak już wspomniano, jej nadmiar może prowadzić do generowania reaktywnych form tlenu, które działają toksycznie na komórki [113]. Wiele doniesień wskazuje na znacząco wysokie poziomy stężenia tego pierwiastka zarówno w surowicy, jak i tkankach nowotworowych. Aby dobrze uwidocznć skalę problemu, warto wspomnieć, że zostało to

udokumentowane dla nowotworów piersi, jelita grubego, szyjki macicy, jajników, płuc, prostaty, żołądka oraz białaczki [139]. Stężenie miedzi w surowicy oraz tkankach u chorych na raka piersi oraz jelita grubego korelowało z wiekiem, a także stadium zaawansowania nowotworu [140–142]. Ponadto, wskazano, że stężenie miedzi w surowicy koreluje z częstością i obciążeniem nowotworami, a także ich zezłośliwieniem oraz nawrotem w chłoniaku Hodgkina, białaczce, mięsakiach, raku mózgu, szyjki macicy, wątroby i płuc [143,144]. Istotnym jest fakt, że stężenie miedzi w surowicy jest związane ze zjawiskiem oporności na chemioterapeutyki, takie jak doksorubicyna, etopozyd lub 5-fluorouracyl w leczeniu zaawansowanego raka piersi, okrężnicy i płuc. Jak wykazały badania, pacjenci, którzy nie reagowali na leczenie, posiadali zwiększone poziomy tego pierwiastka w surowicy o około 130-160% [145]. Mechanizmy odpowiedzialne za ten proces nie są poznane. Jednakże, badania na mysim modelu wykazały, że wzrost stężenia miedzi w surowicy jest związany ze zmniejszeniem jej ilości w wątrobie [146]. Wobec tego, sugeruje się, że rozkład miedzi w organizmie, może być zasadniczo zmieniony przez kancerogenezę. Co więcej, przytoczone dane wskazują, że jej poziom w surowicy może być istotnym biomarkerem obrazującym skuteczność leczenia, a także nawrót choroby nowotworowej [138].

Wiele doniesień wskazuje na powiązanie białka ceruloplazminy z zaburzeniem metabolizmu miedzi w komórkach oraz procesami kancerogenezy. Jej zwiększoną ekspresję w surowicy scharakteryzowano w nowotworach piersi, jelita, płuc i żołądka. Istotnym faktem jest, że po regresji guza nowotworowego, wartości ceruloplazminy powracają do normalnego poziomu [147]. Efekt ten został wykorzystany do monitorowania odpowiedzi na zastosowane leczenie [148].

Miedź odgrywa również kluczową rolę w angiogenezie, która ma podstawowe znaczenie w progresji choroby nowotworowej [149,150]. Proces angiogenezy obejmuje migrację, proliferację i różnicowanie komórek śródbłónka w celu utworzenia nowych naczyń krwionośnych [151]. Uczestniczą w nim czynniki stymulujące, takie jak angiogenina, czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*; VEGF), podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*; bFGF), transformujący czynnik wzrostu β (ang. *transforming growth factor beta*; TGF- β) oraz cytokiny - interleukiny (IL-1; -6; -8) [152]. Pierwsze doniesienia o proangiogennych właściwościach miedzi pochodzą z lat 70 XX wieku, kiedy to McAuslan i Reilly zaobserwowali, że sole miedzi mogą stymulować proliferację i migrację komórek śródbłónka - wczesnego etapu angiogenezy [153]. Dalsze badania przeprowadzone przez Hu, ujawniły, że dodanie miedzi prowadzi do

zwiększonej proliferacji ludzkich komórek śródbłónka, przy jednoczesnym braku surowicy i czynników wzrostu [154]. Mechanizmy molekularne, które kryją się za wywołaniem takiej odpowiedzi są zróżnicowane. Miedź może bezpośrednio wiązać się z angiogeniną, przez co zwiększa powinowactwo do komórek śródbłónka [155]. Ponadto, wykazano, że miedź jest kofaktorem VEGF w procesach proliferacji tych komórek [156]. Istotnym faktem jest również to, że pierwiastek ten może regulować ekspresję czynników wzrostu, takich jak bFGF, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 i fibronektyny [157]. Ostatnie badania wykazały również, że miedź poprzez transport białkami CCS do jądra, może regulować aktywację i stabilizację kompleksu transkrypcyjnego HIF-1 α w warunkach normalnej zawartości tlenu, co prowadzi do zmiany ekspresji czynnika VEGF [158,159]. Podobnie ATOX1, może przemieszczać się do jądra komórek, a tym samym służyć jako czynnik transkrypcyjny zależny od miedzi [160]. Ponadto, może regulować przebudowę naczyń krwionośnych w odpowiedzi na sygnał pochodzący od płytkopochodnego czynnika wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*; PDGF) [161].

4.2. Miedź jako cel terapii przeciwnowotworowych

Podwyższone poziomy stężenia miedzi obserwowane w wielu typach komórek nowotworowych, a także kluczowa rola tego pierwiastka w progresji oraz przerzutowaniu nowotworów, ma istotne znaczenie w kontekście rozwoju nowych strategii leczenia. Obecnie istnieją trzy główne podejścia, mające na celu modulować poziom miedzi w obrębie komórek i tkanek [138]. Pierwsze z nich polega na wykorzystaniu chelatorów metali do wiązania tego pierwiastka, a tym samym zmniejszenia jego biodostępności w komórce. Takie działanie, wiąże się głównie z hamowaniem zależnych od miedzi dynamicznie zachodzących procesów proliferacji oraz angiogenezy w komórkach nowotworowych [162]. Ponadto, wiele doniesień literaturowych wskazuje, że chelatory miedzi poprzez generowanie ROS mogą efektywnie niszczyć komórki raka jelita grubego [163]. Co więcej, proponuje się, że podobna strategia może być skuteczna w leczeniu nowotworów, szczególnie czerniaka z mutacjami genu BRAF [164].

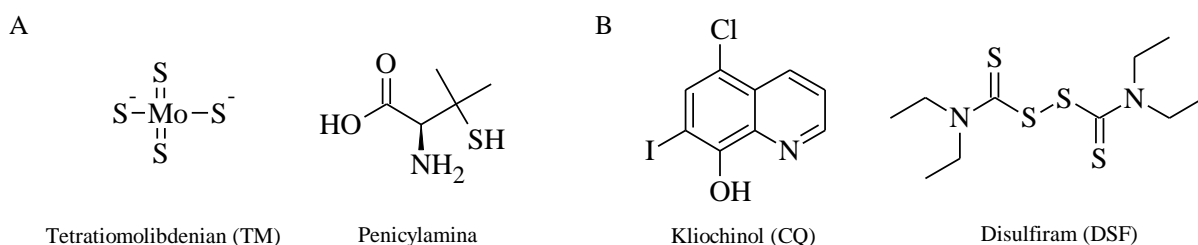
Jednym z najbardziej obiecujących przykładów tej klasy związków jest tetratiomolibdenian (TM) (Ryc. 7). Obecnie, związek ten wszedł w kilka faz badań klinicznych z zastosowaniem do leczenia różnych typów nowotworów (NCT00176774, NCT00176800, NCT01837329) [165–168]. Z kolei, jego mechanizm działania opiera się na hamowaniu angiogenezy w wyniku złożonego działania na aktywność czynnika NF- κ B, ekspresję VEGF

oraz interleukin (IL-1a, IL-6, IL-8) [169–171]. Co więcej, dla TM wykazano efekt hamujący wobec kinaz aktywowanym mitogenem (MEK1/2) oraz BRAF [164]. Co ciekawe, związek ten również wykazuje działanie jako adjuwant, w terapii skojarzonej z doksorubicyną, gdzie obserwowano, zmniejszenie wzrostu guza i wywołanie apoptozy w linii SUM149 raka sutka [172]. Innym chelatorem miedzi o podobnym mechanizmie działania, który wykazuje obiecujące wyniki w leczeniu glejaka wielopostaciowego, a także ukończył II fazę badań klinicznych jest penicylamina (NCT00003751) [165,173].

Innym podejściem jest zastosowanie związków wykazujących działanie jonoforyczne, specyficzne dla miedzi [162,174]. Jonofory metali stanowią odrębny podzbiór środków chelatujących metale [175]. Podobnie jak one, wiążą jony metali tworząc kompleksy. Jednakże w przeciwieństwie do chelatorów, związki te ułatwiają wprowadzenie miedzi do wnętrza komórki, a tym samym zwiększają jej poziom w cytoplazmatycznej puli [175,176]. Takie działanie, może wywoływać bezpośredni efekt cytotoksyczny, poprzez generowanie reaktywnych form tlenu i wywołanie stresu oksydacyjnego [177].

Najbardziej obiecującymi związkami w tym zakresie są klio chinol - CQ (pochodna 8-hydroksychinoliny) (Ryc. 7) oraz disulfiram - DSF (analog ditiokarbaminianu), które wykazują aktywność przeciwnowotworową *in vitro* oraz *in vivo* na modelu mysim [178–180]. Ponadto, wiele doniesień literaturowych wskazuje, że obie pochodne mogą przyczynić się do znacznego zmniejszenia wzrostu guza w modelu ludzkiego raka piersi oraz prostaty [181,182]. Warto podkreślić, że związki te są przedmiotem wielu badań klinicznych (m.in. NCT00742911, NCT01907165, NCT01777919) [165,183–185]. Istotnym faktem jest również selektywność wymienionych pochodnych wobec komórek prawidłowych [186,187]. Zjawisko to może być związane z ich mechanizmem działania, bowiem są one całkowicie zależne od miedzi. Ostatnie badania wykazały, że ligandy bez związanego metalu charakteryzują się nieznaczną aktywnością biologiczną [178]. Wśród wielu doniesień literaturowych dotyczących mechanizmu działania CQ, uwagę zwraca jego wpływ na funkcje białka XIAP [136]. Jak już wcześniej wspomniano, odgrywa ono istotną rolę w utrzymaniu homeostazy miedzi w komórce. Z terapeutycznego punktu widzenia, ciekawą obserwacją jest oddziaływanie miedzi z XIAP, co skutkuje zmianą jego konformacji, a tym samym zablokowaniem możliwości inhibicji kaspaz [188]. Z kolei, ostatnie badania wskazują na wpływ CQ na translokację jądrową białka XIAP, co umożliwia tym samym indukcję kaspazozależnej drogi apoptozy w komórkach raka gruczołu krokowego [189]. Co więcej, badania nad mechanizmem działania klio chinolu oraz disulfiramu w komórkach raka piersi ujawniły, że związki te pod

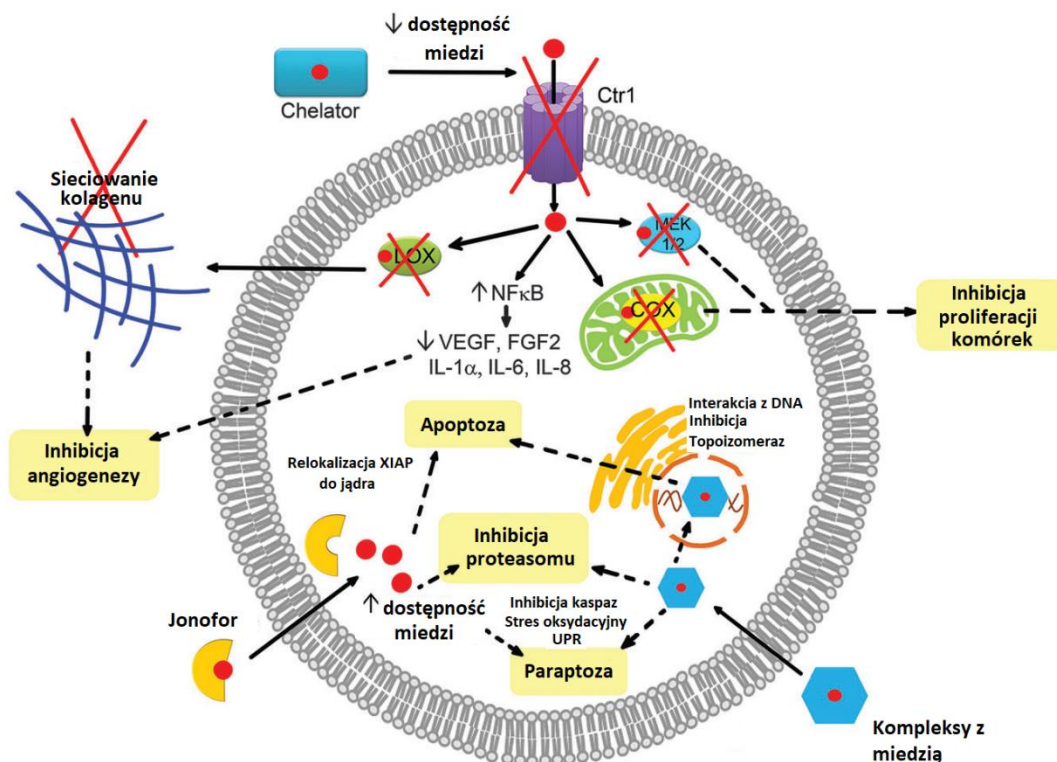
wpływem miedzi hamują aktywność proteasomów, co może wywołać aktywację odpowiedzi na niepoprawnie zwinięte białka - UPR (ang. *unfolded protein response*), finalnie prowadzącą do paraptozy [190]. Podobnie, w komórkach raka piersi, na modelu *in vitro* oraz *in vivo*, wykazano zmniejszenie ekspresji genu supresorowego PTEN oraz serynowo-treoninowej kinazy AKT i 3-kinazy fosfatydoinozytolu (ang. *Phosphoinositide 3-kinase*; PI3K) [182].



Ryc. 7 Przykłady związków klasyfikowanych do grup chelatorów metali (A) oraz jonoforów miedzi (B).

Ostatnim podejściem wpisującym się w strategię mającą na celu modulowanie stężenia tego pierwiastka w komórkach jest wykorzystanie związków kompleksowych, w których atomem centralnym jest miedź [162]. Wiele doniesień opisujących różnorodne związki koordynacyjne miedzi (II) zwraca uwagę na ich aktywność przeciwnowotworową, która wynikała z generowania ROS, interakcji z DNA, inhibicji topoizomeraz czy proteasomów [191,192]. Jak wykazały badania, interakcje z DNA, polegały głównie na niekowalencyjnych oddziaływaniach, które mogły obejmować interkalację oraz wiązanie w małym i dużym rowku DNA. W wielu przypadkach, interkalacja związków do DNA prowadziła do deformacji jego helisy, sprzyjając późniejszym procesom rozszczepiania nici [162]. Ostatnie badania, wykazały, że procesy te następowały poprzez utlenienie nukleotydów, hydrolizę grupy fosforanowej oraz utlenianie deoksyrybozy. Co więcej, uważa się, że za takie działanie odpowiedzialne są reaktywne formy tlenu generowane na drodze reakcji Fentona [193]. Odpowiedź komórkowa po uszkodzeniu DNA, obejmowała aktywację mechanizmów naprawczych, a w przypadku nieodwracalnych uszkodzeń aktywację szlaku programowanej śmierci komórki. Garcia-Gimenez i in., wykazał, że apoptoza w komórkach Caco-2 indukowana jest w wyniku aktywacji białka p53, a także zmniejszenia ekspresji Bcl-2 [194]. Z drugiej strony, wiele doniesień pokazuje, że nieliczne związki koordynacyjne miedzi (II) indukują apoptozę na drodze zależnej od kaspaz -3 i -9 [195,196]. Związane jest to ze zdolnością wielu związków do inhibicji kaspaz i aktywacji ścieżki od nich niezależnej, co w konsekwencji prowadzi do paraptozy [197].

Podobnie, ten typ śmierci komórkowej jest wywołany jako odpowiedź na inhibicję proteasomów, co związane jest z wywołaniem stresu siateczki śródplazmatycznej ER (ang. *endoplasmic reticulum*) [198].

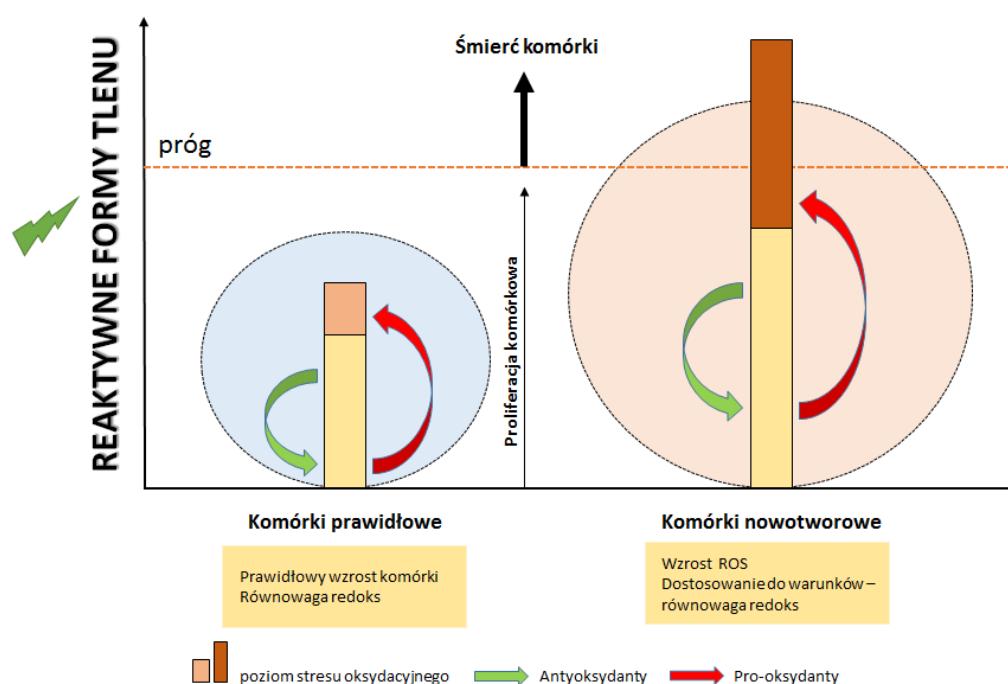


Ryc. 8 Strategie wiązania miedzi przez różne klasy związków i możliwe ich działanie w komórce [138], zmodyfikowano.

5. Terapie oparte na wywołaniu stresu oksydacyjnego

W ostatnim czasie coraz większym zainteresowaniem cieszy się nurt terapii oksydacyjnej, która wpisuje się w założenia podejścia polifarmakologicznego. Podstawą tej terapii jest zaburzenie równowagi pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych form tlenu, a systemem ich eliminacji poprzez mechanizmy obronne komórki [199]. W wyniku działania czynników egzogennych, następuje wzmożona produkcja, a następnie akumulacja ROS, które mogą indukować odpowiedź komórkową. W konsekwencji dochodzi do zmiany ekspresji wielu genów, zatrzymania cyklu komórkowego, aktywacji czynników transkrypcyjnych, a w ostateczności do wyzwolenia śmierci komórkowej [107,200]. Wiele danych literaturowych wskazuje, że zwiększony stres oksydacyjny odgrywa kluczową rolę w różnych stanach patologicznych, takich jak choroby neurodegeneracyjne, nowotworowe oraz starzenie [200,201].

Szczególnie terapia ta może być skutecznie wykorzystywana w leczeniu chorób nowotworowych, bowiem łączy dwa ważne aspekty, takie jak selektywność terapeutyczną oraz mniejsze ryzyko lekooporności [202,203]. U podstaw tego podejścia leży obserwacja zwiększonego stężenia reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych w porównaniu z komórkami normalnymi. Różnice pomiędzy tymi typami komórek wynikają z innego profilu genetycznego oraz metabolicznego [204–206]. Komórki nowotworowe charakteryzują się podwyższonym podstawowym poziomem ROS, ze względu na zmiany aktywności metabolicznej, a przede wszystkim wzmoczoną glikolizę tlenową (efekt Warburga) [207]. Tym samym, znajdując się w stanie stałego stresu oksydacyjnego posiadają zmodyfikowany system obrony antyoksydacyjnej, który pozwala zaadaptować się do tych warunków i uniknąć negatywnych skutków oddziaływania ROS (Ryc. 9) [208,209].



Ryc. 9 Podstawy strategii wykorzystującej stres oksydacyjny w terapiach przeciwnowotworowych [205,209].

Warto w tym miejscu podkreślić, dwoistość wpływu reaktywnych form tlenu na metabolizm komórki. Wysoki ich poziom może wpływać na progresję cyklu komórkowego, wzmoczoną proliferację i indukcję dalszych zmian prowadzących do transformacji komórek [210]. Z drugiej strony, może powodować zmiany wrażliwości komórek na czynniki zewnętrzne, takie jak związki cytotoksyczne i kompleksy metali [211,212]. Takie działanie prowadzi do utrzymania długotrwałego stresu oksydacyjnego, co w konsekwencji skutkuje

zniszczeniem mechanizmów adaptacyjnych [199,205]. Zatem, zastosowanie chemioterapeutyków, które są zdolne do generowania reaktywnych form tlenu lub zmniejszenia wydajności systemu antyoksydacyjnego prowadzi do przekroczenia poziomu granicznego ROS, powyżej którego dochodzi do aktywacji szlaków sygnałowych związanych ze stresem oksydacyjnym (Ryc. 9). Ich uruchomienie w ostateczności kieruje komórki na szlak programowanej śmierci [205,209].

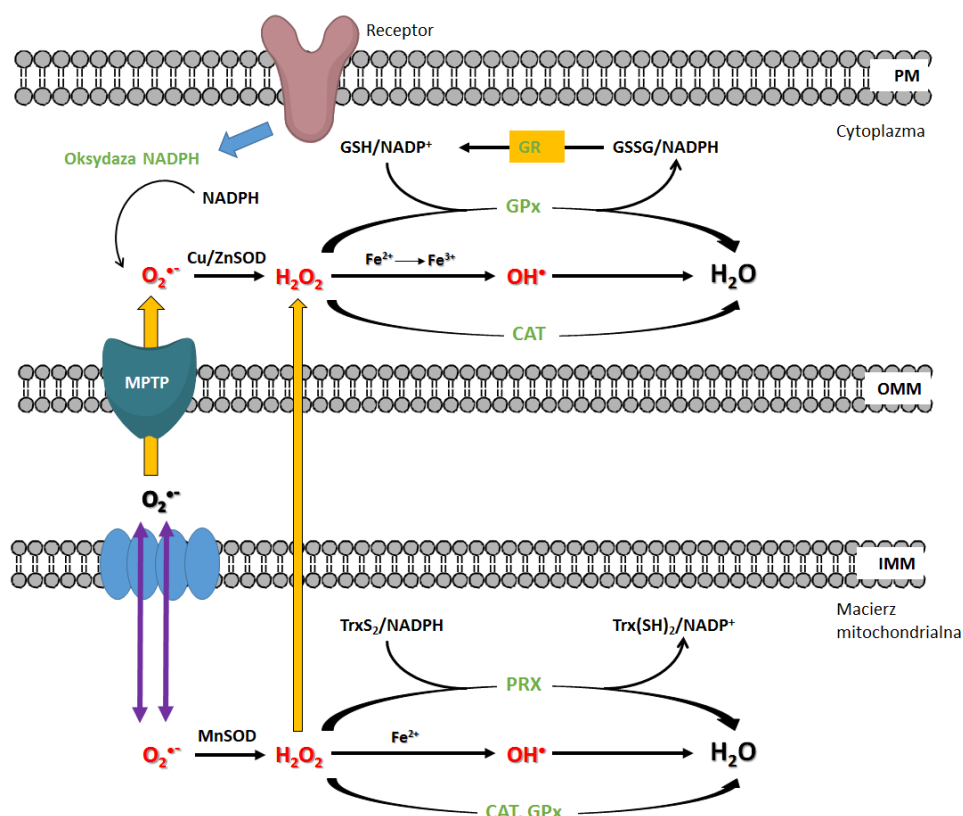
Prezentowane podejście może być skuteczną strategią eliminacji komórek należących do nowotworów jelita grubego, trzustki, prostaty oraz piersi, które charakteryzują się istotnie podwyższonym podstawowym poziomem ROS [139,213,214]. Co ważne, w wielu doniesieniach wykazano, że nadekspresja białek P-glikoproteiny w komórkach nowotworowych, a także zjawisko oporności na leki (ang. *multi-drug resistance*; MDR) jest związane ze zwiększonym poziomem ROS i zmodyfikowaną zdolnością antyoksydacyjną [215]. Warto podkreślić, że szczególnie wysoki poziom molekuł należących do systemu obrony antyoksydacyjnej, takich jak glutation (ang. *glutathione*; GSH) czy katalaza (ang. *catalase*; CAT) ma kluczowe znaczenie w rozwoju zjawiska oporności na leki [216–219]. Interesującym zagadnieniem jest pośrednictwo kinaz w indukcji procesów autofagii oraz apoptozy, które wskazują na ich współzależność, a także mogą zapewniać możliwości w przezwycięzeniu zjawiska MDR [220,221].

5.1. Stres oksydacyjny a apoptoza

Wzmoczona produkcja reaktywnych form tlenu może wpływać na regulację genów i białek odpowiedzialnych za kontrolę wewnątrzkomórkowego potencjału redoks [222]. Centralną rolę w tym systemie pełnią mitochondria, które nie tylko są głównym źródłem produkcji reaktywnych form tlenu, ale również posiadają rozbudowany system antyoksydacyjny (Ryc. 10) [200,223]. Składa się on zarówno z białek enzymatycznych, m.in. dysmutazy ponadtlenkowej (ang. *superoxide dismutase*; SOD), katalazy, peroksydazy (ang. *glutathione peroxidase*; GPx) i reduktazy glutationu (ang. *glutathione reductase*; GR), jak i składników nieenzymatycznych - glutationu, tioredoksyny (ang. *thioredoxin*; Trx), oraz witamin C i E [200,224].

Szczególną rolę w tym systemie pełnią geny, które kodują enzymy MnSOD oraz CAT. Pierwszy z tych enzymów jest odpowiedzialny za przekształcenie anionorodnika

ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru, który jest następnie eliminowany przez katalazę w cytozolu (Ryc. 10) [107,225]. Co ciekawe, ostatnie badania sugerują silny związek mitochondrialnego poziomu ROS oraz aktywności MnSOD z przejściem pomiędzy fazami związanymi ze stanami proliferacji i spoczynku cyklu komórkowego [226,227]. Sarsour i in., wykazali, że aktywność MnSOD jest wysoka w komórkach znajdujących się w fazach cyklu komórkowego G₀/G₁ i S w porównaniu z G₂ oraz M [227]. Podobnie, poziom ROS wzrasta w fazach aktywnych cyklu komórkowego, a następnie spada w stanie spoczynku [228]. Związane jest to z pełnioną funkcją reaktywnych form tlenu jako cząsteczek sygnałowych, odpowiedzialnych za aktywację i regulację wielu ważnych procesów komórkowych, takich jak transdukcja sygnałów, metabolizm, proliferacja oraz apoptoza. Podwójna funkcja ROS, jako cząsteczek sygnałowych lub toksycznych produktów ubocznych, może wynikać z różnic w ich stężeniu oraz lokalizacji subkomórkowej [206,229]. Z kolei, gen i białko katalazy jak już wcześniej wspomniano, może wpływać na mechanizm oporności wielolekowej, a także chronić komórki nowotworowe przed indukowaniem apoptozy [219,230]. Prowadzi to do ogólnego wniosku, że oba białka są regulowane zależnie od szybkości metabolizmu komórek [227,228].



Ryc. 10 System komórkowej regulacji redoks. Skróty: PM (ang. *plasma membrane*) – błona komórkowa; OMM (ang. *outer mitochondrial membrane*) – zewnętrzna błona mitochondrialna; IMM (ang. *inner mitochondrial membrane*) – wewnętrzna błona mitochondrialna; MPTP - por zmiany przepuszczalności mitochondrialnej [206].

Za główne układy redukujące i chroniące przed stresem oksydacyjnym w komórkach uważane są systemy oparte na glutationie i tioredoksynie [222]. Warto w tym miejscu podkreślić, że GSH jest największym wewnątrzkomórkowym przeciwutleniaczem, składającym się z trzech reszt aminokwasowych: cysteiny, glutaminy i glicyny, posiadającym grupę tiolową (SH), która jest odpowiedzialna za właściwości redukcyjne [102]. Ponadto, GSH pełni kluczową rolę w utrzymaniu równowagi redoks poprzez regulację stosunku form utlenionych glutationu GSSG do form zredukowanych GSH przy udziale NADPH [206]. W zdrowych komórkach i tkankach przeważającą część zasobów glutationu stanowi jego forma zredukowana, pozostałe 10% to forma utleniona [102]. Co istotne, w wyniku nadmiernej produkcji ROS indukowanej chemioterapeutykami lub kompleksami metali, dochodzi do nagromadzenia wolnych rodników, co skutkuje zmniejszeniem poziomu stężenia glutationu poprzez obniżenie zdolności redukcji GSSG do GSH [112]. W związku z następującym przejściem dochodzi do zwiększonej wrażliwości komórek na stres oksydacyjny, co w konsekwencji prowadzi do wyzwolenia apoptozy [231–233]. Interesującym faktem, jest udział GSH w procesie oporności na niektóre leki. Zjawisko to jest związane ze wzrostem poziomu GSH, a także aktywności S-transferazy glutationu (GST) i ligazy γ -glutamylcysteiny (GLC) [234]. Bowiern podwyższona ekspresja GST, w połączeniu z wysokimi poziomami GSH, może zwiększyć szybkość sprzęgania i detoksykacji chemioterapeutyków, zmniejszając ich efektywność [216,224].

Zgodnie z danymi literaturowymi, w odpowiedzi na zaburzenie wewnątrzkomórkowej homeostazy potencjału redoks, a tym samym wywołanie stresu oksydacyjnego, aktywowanych jest wiele szlaków sygnałowych. Jednym z najważniejszych jest proapoptotyczna ścieżka sygnalizacyjna zależna od kinaz [235]. Aktywacja kaskady sygnałowej związanej z kinazami białkowymi ma kluczowe znaczenie w wykryciu stresu oksydacyjnego, a następnie uruchomieniu procesu transdukcji sygnałów, inicjujących reakcję komórkową. Kluczowe regulatory, które są aktywowane przez ROS obejmują kinazy białkowe aktywowane mitogenami (MAPK), kinazę 1 sygnalizującą apoptozę (ASK1), p38 i kinazy JNK [235–237]. Ciekawymi obserwacjami są te związane z chelatowaniem metali, szczególnie jonów żelaza. Badania wykazały, że chelatory poprzez generowanie ROS, mogą zwiększać fosforylację kinaz JNK, MAPK i p38, które w dalszej kolejności wpływają na aktywację białek p53 oraz ATF-2, zapobiegając ich degradacji przez proteasom [238]. Przeciwny efekt wykazano dla deferoksaminy (DFO), która w znaczący sposób wpływa obniżenie aktywność redoks żelaza (III), poprzez tworzenie z nim nieaktywnych kompleksów, a co za tym idzie brakiem

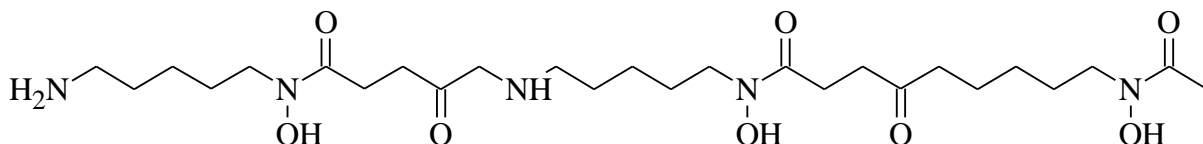
oddziaływania z kinazami JNK oraz p38 [238,239]. Aktywowane kinazy przeważnie indukują apoptozę poprzez mechanizmy, które zachodzą w mitochondriach i związane są z uwolnieniem cytochromu C, a następnie aktywację kaspaz -3, -7 i -9 [240]. Alternatywnie, z mitochondriów do cytozolu mogą być uwalniane inne czynniki takie jak, czynnik wywołujący apoptozę – AIF i endonukleaza - Endo G, które wywołują apoptozę niezależnie od aktywacji kaskady kaspaz [241]. Białka uwolnione do cytozolu ulegają translokacji do jądra komórkowego, gdzie zaangażowane są w procesy fragmentacji DNA (duże fragmenty - 50 tysięcy par zasad) i kondensacji chromatyny [242]. Z drugiej strony, kinazy JNK oraz p38 w odpowiedzi na stres oksydacyjny mogą przyczyniać się do indukcji autofagii [220].

6. Chelatory żelaza w terapiach przeciwnowotworowych

Rozwój badań nad chelatorami żelaza jako środkami terapeutycznymi dotychczas skupiał się głównie na ich zastosowaniu w leczeniu zaburzeń gospodarki żelazem. Jednakże związki te, ze względu na swoje interesujące właściwości mogą być niezwykle skutecznymi chemioterapeutykami w leczeniu chorób nowotworowych [83,243]. Do tej klasy związków należą przede wszystkim siderofory - substancje produkowane przez mikroorganizmy, a także syntetycznie wytworzone związki, takie jak deferazyroks (DEF) czy pochodne tiosemikarbazonu (TSC).

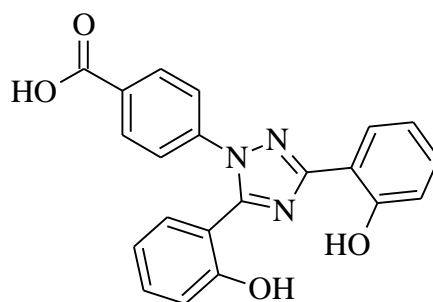
Jednym z interesujących sideroforów jest heksadentny chelator - deferoksamina (ang. *deferoxamine*) - Ryc. 11, wydzielany przez bakterie *Streptomyces pilosus*. Związek ten stosowany jest głównie w leczeniu β -talasemii [244]. DFO wykazuje wysokie powinowactwo do jonów Fe^{3+} , co prowadzi do tworzenia z nim trwałych kompleksów w stosunku 1:1. Efektem takiego działania jest zablokowanie sfery koordynacji, a więc dostępu do centralnego jonu żelaza, co przyczynia się do hamowania wytwarzania reaktywnych form tlenu [245]. Wiele doniesień literaturowych prezentujących badania *in vitro*, *in vivo* oraz próby kliniczne wskazują na potencjał DFO jako środka przeciwnowotworowego. Szczególnie, dużą skuteczność DFO obserwowano w leczeniu nerwiaka zarodkowego oraz białaczki [246,247]. Jak wykazały, późniejsze badania jego mechanizm związany jest z deplecją żelaza komórkowego, co wpływa na aktywność RR, a tym samym na efektywność syntezy DNA w trakcie cyklu komórkowego [248]. Jednakże, otrzymane wyniki na modelach *in vitro*, nie przełożyły się na próby kliniczne. U pacjentów z nerwiakiem zarodkowym, tylko w jednym przypadku zaobserwowano 48% spadek wielkości guza [249]. Z drugiej strony, znaczną

odpowieź na leczenie DFO otrzymano u pacjentów z nowotworami wątroby opornymi na chemoterapię [250]. Znacznym ograniczeniem skuteczności tego ligandu jest jego wysoka hydrofilowość, która utrudnia absorpcję z przewodu pokarmowego, a także przyspiesza jego metabolizm we krwi - okres półtrwania DFO w osoczu wynosi 12 minut. Natomiast iniekcja leku do organizmu wywołuje niepożądane skutki u większości pacjentów [251].



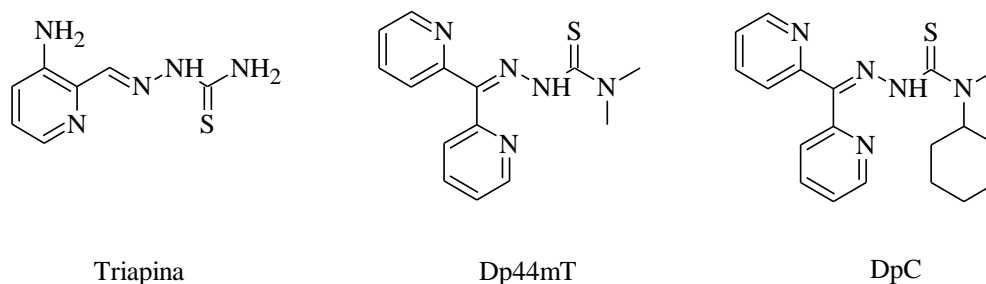
Ryc. 11 Struktura deferoksaminy – DFO

Kolejnym chelatorem jest deferazyroks (ang. *Deferasirox*) - Ryc. 12, który jako pierwszy lek został zatwierdzony przez FDA do leczenia β -talasemii. W odróżnieniu od DFO, jest to związek wysoce lipofilowy, który kompleksuje jony żelaza w stosunku 2:1 [252]. Wiele doniesień wskazuje, że DEF posiada silne właściwości antynowotworowe w wielu modelach przedklinicznych. Co więcej, dla tego związku wskazuje się wielotorowe działanie, które nie tylko skupia się na chelatacji żelaza, ale również na aktywacji różnych szlaków sygnałowych [243]. Ostatnie badania wykazały, że DEF może indukować zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S, a także fragmentację DNA w komórkach raka wątroby [253]. W badaniach nad rakiem przełyku i płuc, wykazano, że deferazyroks zwiększa ekspresję genu *Ndr1* oraz białka $p21^{CIP/WAF1}$ [254]. Z kolei, w komórkach białaczki szpikowej związek ten może indukować kaspazę 3 oraz wpływać hamująco na aktywność NF- κ B [255]. Dalsze badania kliniczne u pacjentów z ostrą białaczką szpikową oporną na chemioterapię, potwierdziły skuteczność DEF, prowadząc do całkowitego zaniku tego typu nowotworu [256].



Ryc. 12 Struktura deferazyroksu

Najliczniejszą grupę w tej klasie stanowią tiosemikarbazony, które są dobrze znanymi związkami o bardzo silnych właściwościach przeciwnowotworowych. Właściwości te najprawdopodobniej zawdzięczają zdolności do chelatowania jonów metali oraz generowania ROS [97,99,100]. Jednakże dokładny mechanizm działania TSC nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. Wiele doniesień literaturowych postuluje wielotorowy mechanizm działania dla tej grupy związków, który może opierać się na eliminacji żelaza z wnętrza komórki lub blokowania jego wychwytu z przestrzeni międzykomórkowej, co tym samym może prowadzić do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G₁/S oraz hamowania aktywności RR [257,258]. Działanie takie może być związane z powstawaniem redoks aktywnych kompleksów TSC-Fe, które mogą generować reaktywne formy tlenu w reakcji Fentona [108]. Jednakże, jak już wcześniej wspomniano ich powstawanie jest uzależnione od występowania w strukturze pochodnych tiosemikarbazonu odpowiednich „miękkich” atomów donorowych [259]. Ponadto, najnowsze badania wskazują, że dodatek jonów metali może znacząco zwiększyć aktywność niektórych pochodnych TSC [260,261]. Dlatego też, obserwacje te doprowadziły do alternatywnej strategii wykorzystania pochodnych tiosemikarbazonu jako jonoforów w terapiach przeciwnowotworowych. Ponadto, Akladios i in., wskazali, że połączenie kompleksów TSC-Cu(II) z azinami wpływa na zaburzenie homeostazy redoks i śmierć komórek nowotworowych [262]. Warto zauważyć, że związki należące do tej grupy mogą być wysoce obiecującymi potencjalnymi lekami, jednakże niepełna wiedza na temat ich mechanizmów działania, znacznie utrudnia wdrożenie do leczenia.



Ryc. 13 Struktury pochodnych tiosemikarbazonu

Pierwszym związkiem z tej grupy, który ukończył II fazę badań klinicznych jest Triapina (pochodna 3-aminopirydino-karboksyaldehydu; 3-AP) (Ryc. 13). Badania nad jej mechanizmem działania wskazują, że w wyniku redukcji kompleksów Triapina-Fe(III) wytwarzane są reaktywne formy tlenu. Odpowiadają one za destabilizację rodnika

tyrozylowego w RR, powodując zahamowanie jej aktywności, a w konsekwencji zablokowanie syntezy i naprawy DNA [263]. Ponadto wykazano, że 3-AP może pośredniczyć w utlenieniu mitochondrialnej tioredoksyny 2 (Trx2) [264], a także askorbinianu oraz deplecji glutationu [265], co wskazuje jej wpływ na system antyoksydacyjny komórki. Wiele doniesień literaturowych, wskazuje, że związek ten jest szczególnie skuteczny w leczeniu białaczki L1210, raka płuca M109 i jajnika A2780 u myszy. Ponadto wykazano, że synergistyczne działanie 3-AP z innymi chemioterapeutykami, takimi jak cisplatyna, doksorubicyna (DOX) i etopozyd, skutkowało regresją guza w modelach mysich [266]. W trakcie badań klinicznych skuteczność 3-AP wykazano w połączeniu z gemcytabiną w leczeniu zaawansowanego gruczolaka pęcherzyka żółciowego oraz dwunastnicy [267]. Stosowany związek oddzielnie wykazał niewielką aktywność wobec płaskonabłonkowego raka głowy i szyi [268].

Kolejne dwa związki przedstawione na Ryc. 13 - Dp44mT oraz DpC należą do szeregu wysoce aktywnych pochodnych opartych na ketonie di-2-pirydylowym. Ugrupowanie to wydaje się być szczególnie interesującym układem z punktu widzenia podejścia polifarmakologicznego oraz koncepcji struktur uprzywilejowanych. Mianowicie, związki zawierające fragment di-pirydylowy mogą wykazywać zdolność do inhibicji tzw. „triady śmierci” (ang. *triad of death*) w komórkach nowotworowych. Zjawisko to skupia się na zmniejszeniu wzrostu guza, pokonaniu zjawiska oporności na leki oraz hamowaniu procesu przerzutowania [269]. Kluczowym mechanizmem działania Dp44mT oraz DpC jest zdolność do wiązania jonów żelaza oraz miedzi, co może wywołać efekt tzw. „podwójnego uderzenia” (ang. *double punch*). Po pierwsze, związanie wewnątrzkomórkowego żelaza powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego. Po drugie, tworzenie redoks aktywnych kompleksów z żelazem lub miedzią, pozwala na uczestnictwo w reakcji Fentona i Haber-Weissa. Efektem tego jest generowanie reaktywnych form tlenu, szczególnie rodnika hydroksylowego, który działa cytotoksycznie na komórki [270,271]. Ostatnie, badania w grupie prof. Richardсона ujawniły szczególnie wysoką skuteczność kompleksu Dp44mT z Cu(II) wobec komórek nerwiaka zarodkowego oraz raka piersi. Jak wykazano, mogło być to związane z lokalizacją tych kompleksów w lizosomach, które w wyniku wysokiej aktywności redoks, indukowały stres oksydacyjny prowadzący do uszkodzenia błony lizosomów i uwolnienia katepsyn do cytozolu. Z kolei, takie działanie prowadziło do aktywacji mitochondrialnego mechanizmu wyzwolenia apoptozy [271]. Ponadto, jak się okazało akumulacja związków Dp44mT oraz DpC w lizosomach pozwoliła im uniknąć zjawiska MDR, a tym samym wydalenia z komórki. Co więcej, najnowsze badania wskazały na wzrost aktywności tych pochodnych w komórkach

z nadekspresją P-glikoproteiny [272]. Jak już wspomniano wcześniej, obie pochodne poprzez wpływ na ekspresję genu *Ndr1*, mogą regulować wiele ścieżek sygnałowych w komórkach [93]. W związku z tym, wielocelowany mechanizm działania *Dp44mT* przedkłada się na jego wysoką aktywność względem ponad 28 nowotworowych linii komórkowych, m.in. białaczki, szpiczaka mnogiego, raka piersi. Ponadto, badania na komórkach normalnych krwi, fibroblastów oraz nabłonkowych sutka wskazały na selektywność tej pochodnej [273–275]. Podobnie, w badaniach *in vivo* związek ten wykazał silne właściwości hamujące wzrost litych guzów. Jednakże, badania prowadzone na modelu zwierzęcym ujawniły również kardi toksyczność, która zdyskwalifikowała *Dp44mT* z dalszych badań klinicznych [275]. Z kolei *DpC*, jak ujawniły badania na wielu modelach *in vitro* oraz *in vivo*, wykazuje o wiele wyższą skuteczność oraz tolerancję niż jego poprzednik I-szej generacji [276]. Najnowsze doniesienia wskazują na szczególną skuteczność *DpC* względem ludzkiego raka trzustki na modelu *in vivo*, wyższą niż stosowany obecnie lek - gemcytabina [82]. Ponadto, dobra tolerancja na lek podany drogą dożylną oraz doustną, brak większych efektów ubocznych w optymalnych dawkach, a także dobry profil farmakokinetyczny sprawiły, że *DpC* w 2016 roku wszedł w I fazę badań klinicznych (NCT02688101) [269].

Innymi fragmentami strukturalnymi, szczególnie interesującymi w kontekście projektowania nowych pochodnych TSC to chinolina oraz 8-hydroksychinolina (8-HQ). Oba te fragmenty należą do grona struktur uprzywilejowanych. Ich właściwości opierają się głównie na silnych zdolnościach do chelatowania jonów metali, takich jak miedź, żelazo, cynk, kobalt czy nikiel. Dodatkowo, liczne badania dotyczące mechanizmów działania związków zawierających w swojej strukturze motyw chinolinowy pokazują ich wysokie powinowactwo do różnych celów molekularnych [34,36]. Jak pokazują liczne dane literaturowe, wysoka aktywność biologiczna chinoliny, jak i jej pochodnych jest związana z chelatowaniem redoks aktywnych jonów metali [277–279]. W przypadku 8-hydroksychinoliny jony metali mogą być koordynowane przez atom tlenu oraz atom azotu pierścienia chinoliny [174]. Takie działanie skutkuje generowaniem ROS, w tym rodnika hydroksylowego, anionorodnika ponadtlenkowego, czy też tlenku azotu [278,280]. Ponadto, ostatnie badania nad mechanizmem działania klio chinolu, który jest pochodną 8-HQ, ujawniają jego silne właściwości jonoforyczne względem miedzi w komórkach nowotworowych. Dodatkowo, inne badania pokazują wpływ jonów miedzi i cynku na działanie CQ względem inhibicji dysmutazy ponadtlenkowej [281]. Podobnie, benzyloamidy oparte na 8-HQ mogą oddziaływać z tiolami i białkami, wywołując zmiany ekspresji różnych genów związanych ze stresem oksydacyjnym

[282]. Z drugiej strony, innym możliwym mechanizmem działania, charakteryzującym większość planarnych związków aromatycznych, takich jak chinolina, jest interakcja z DNA. Kompleksy z metalami mogą odwracalnie wiązać się z DNA poprzez oddziaływania niekowalencyjne, takie jak wiązanie elektrostatyczne, wiązanie do dużego rowka oraz interkalację. Obecnie uważa się, że to interkalacja związków pomiędzy zasady DNA jest odpowiedzialna za wywołanie efektu przeciwnowotworowego [283]. Wobec tego, wszystkie te przesłanki skłaniają do przeświadczenia, że połączenie fragmentu chinolinowego z ugrupowaniem tiosemikarbazonu może zwiększyć zdolność do kompleksowania jonów metali, a także zwiększyć aktywność redoksową utworzonych kompleksów z docelowymi metalami [284].

III. BADANIA WŁASNE

1. Aktywność antyproliferacyjna *in vitro* badanych pochodnych tiosemikarbazonu

Eksperymenty przeprowadzone w ramach przygotowania niniejszej pracy zostały wykonane w Zakładzie Fizyki Ciała Stałego, Śląskim Międzyuczelnianym Centrum Edukacji i Badań Interdyscyplinarnych Uniwersytetu Śląskiego. Analizie biologicznej poddano szereg pochodnych tiosemikarbazonu zaprojektowanych i zsyntezowanych w Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Śląskiego. Przeważającą część z nich, stanowią nowe pochodne TSC syntezowane przez mgr Martę Rejmund (związki o kodowaniu MR) w ramach pracy doktorskiej prowadzonej pod kierownictwem prof. Jarosława Polańskiego. Co więcej, w niniejszej rozprawie doktorskiej ujęto szereg najbardziej aktywnych pochodnych opartych na fragmentach ketonu di-2-pirydylowego oraz chinoliny, które zostały zsyntezowane przez dr inż. Macieja Serdę (związki o kodowaniu MS) i były przedmiotem jego pracy doktorskiej pod tym samym kierownictwem [285].

Analizę cytotoksyczności dla wszystkich nowych pochodnych przeprowadzono wobec komórek raka jelita grubego linii HCT116 typu dzikiego (HCT116 p53^{+/+}), a także komórek z nokautem genu TP53 (HCT116 p53^{-/-}), stosując model 72-godzinny. Wybór powyższych linii komórkowych, wiąże się z uwarunkowaniem nowotworów okrężnicy do zwiększonego poboru, a także metabolizmu żelaza [286]. Co więcej, obserwuje się również zależność ekspresji ferrytyny, kompleksującej jony żelaza (III) od statusu białka p53 [61]. Dla najbardziej aktywnych nowych związków, wykonano również ocenę cytotoksyczności wobec komórek nowotworów mózgu (linie U-251 oraz Hs 683) i piersi (MCF-7). Linia komórkowa MCF-7 została wybrana do badań, ze względu na wysoką częstotliwość zachorowań na ten typ nowotworu złośliwego oraz silne powiązanie zwiększonego metabolizmu żelaza i miedzi w progresji, zezłośliwieniu oraz przerzutowości nowotworów piersi [287,288]. Z drugiej strony, jednymi z najbardziej agresywnych nowotworów są guzy mózgu. W ich przypadku, nie ma skutecznych metod leczenia, a prognozy po stosowanych terapiach są na ogół złe. Średni czas przeżycia przy zastosowaniu terapii skojarzonej nie przekracza 2 lat [289]. Również, warto podkreślić, że w linii komórkowej U-251 obserwuje się mutację punktową w białku p53 (R273H), polegającą na substytucji argininy w pozycji 273 na aminokwas histydynę, co skutkuje zmianą funkcji tego białka [290]. Jest to szczególnie istotne, z terapeutycznego punktu widzenia. Obecne dane literaturowe pokazują, że w ponad 50% przypadków nowotworów stwierdzono mutację w genie TP53, co często powiązane jest ze zjawiskiem oporności na

chemioterapię [291]. Interesującym faktem jest, że nowotwory mózgu charakteryzują się zmienionym metabolizmem żelaza, a w konsekwencji również podatnością na leczenie chelatorami żelaza [292]. Ostatnie badania na modelu linii komórkowej U-251 pokazują obiecujące wyniki w przypadku stosowania DFO, jak i deferypronu [293]. Jednakże, pomimo uzyskanych obiecujących rezultatów, nadal brakuje raportów na temat aktywności i zastosowania pochodnych TSC w leczeniu tego typu nowotworów. Jednocześnie DFO z uwagi na niekorzystne parametry farmakokinetyczne nie będzie dobrym lekiem do stosowania w przypadku nowotworów mózgu. Z punktu widzenia, zastosowania związków cytotoksycznych w terapiach, szczególnie istotny jest wysoki profil selektywności wobec komórek prawidłowych. Dlatego, też dla wszystkich aktywnych pochodnych TSC dokonano oceny toksyczności wobec komórek prawidłowych ludzkich fibroblastów - linia NHDF.

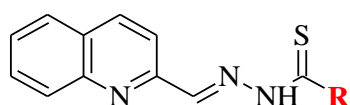
Oznaczenia w tym zakresie, wykonano przy pomocy testu MTS, który jest kolorymetryczną metodą detekcji proliferujących komórek. Test ten opiera się na zdolności enzymu - dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcenia pochodnej tetrazolowej do formazanu. Ilość powstającego w reakcji produktu jest oznaczana spektrofotometrycznie oraz proporcjonalna do ilości metabolicznie aktywnych komórek. Na tej podstawie, możliwe jest wyliczenie wartości IC_{50} , czyli stężenia które powoduje 50% zahamowanie wzrostu populacji komórek. W poniższych tabelach 1-13, przedstawiono otrzymane wartości stężeń IC_{50} dla wszystkich zbadanych TSC, które pogrupowano pod względem strukturalnym. Dla ułatwienia zastosowano wizualizację poziomu aktywności przy pomocy kolorów. Pochodne, które charakteryzują się silnym działaniem antyproliferacyjnym ($IC_{50} < 1 \mu M$) oznaczono kolorem czerwonym, te o umiarkowanej aktywności (IC_{50} w zakresie $1 - 10 \mu M$) kolorem żółtym, a związki zaklasyfikowane jako słabo aktywne ($IC_{50} > 10 \mu M$) - kolorem szarym. Związki o IC_{50} przekraczającym $25 \mu M$ uznano za nieaktywne. Z kolei, związki referencyjne dla konkretnych serii pochodnych TSC oznaczono w tabelach czcionką pogrubioną.

Pierwszą serię opisywanych związków stanowiły pochodne oparte na fragmencie chinoliny. Wyniki dla tej grupy przedstawiono w tabeli 1. Najbardziej aktywnymi nowymi związkami wśród tej serii okazały się pochodne MR95, MR96 oraz MR12K zawierające w swej strukturze układ trifluorometylowy dołączony do terminalnego pierścienia aromatycznego. Związki te wykazywały wysoką aktywność wobec wszystkich badanych linii komórek nowotworowych. Najwyższą skuteczność w przypadku linii HCT116 typu dzikiego odnotowano dla pochodnej MR12K, dla której wyliczona wartość IC_{50} wynosiła $0,107 \mu M$. Dla pozostałych dwóch pochodnych MR95, MR96 obserwowano nieco mniejszy poziom

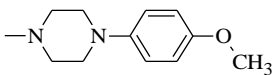
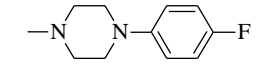
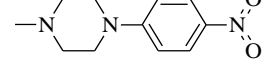
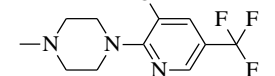
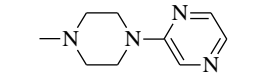
aktywności, gdzie wyliczone stężenie IC_{50} wynosiło odpowiednio 0,139 μM oraz 0,183 μM . Odminną sytuację odnotowano w przypadku linii raka jelita grubego z nokautem genu TP53. Dla pochodnej MR95 obserwowano specyficzność względem tej linii komórkowej, w przeciwieństwie do MR96 oraz MR12K. Mianowicie, analog MR95 wykazywał ok. 2-krotnie wyższą skuteczność wobec HCT116 p53^{-/-} niż wobec komórek typu dzikiego. Na podstawie analizy cytotoksyczności tej serii związków, można wysnuć wniosek, że przyczyną utraty selektywności wobec linii komórkowej z nokautem genu TP53, może być podstawienie terminalnego pierścienia aromatycznego atomami chloru, co obserwowano w przypadku pochodnych MR12K oraz MR97. W przypadku linii komórkowej nowotworu piersi, można zaobserwować wysoką aktywność biologiczną wszystkich halogenowanych pochodnych (MR95, MR96, MR97, MR5K3, MR12K), dla których wyliczony parametr IC_{50} osiągał wartość w zakresie 0,066 μM - 0,083 μM . Z kolei, ciekawą zależność można zauważyć w przypadku analizy cytotoksyczności tych pięciu pochodnych wobec obu linii nowotworu mózgu - U-251 oraz Hs 683. Mianowicie, fluorowcowane pochodne (MR95, MR96, MR5K3, MR12K) osiągały znacznie wyższą aktywność antyproliferacyjną wobec tych linii komórkowych niż pochodna MR97, której terminalny pierścień aromatyczny podstawiony jest dwoma atomami chloru. Jest to szczególnie widoczne, w przypadku linii glejaka Hs 683, ponieważ osiągnięcie tego samego efektu jak w przypadku fluorowcowanych pochodnych było możliwe dopiero przy zastosowaniu ponad 26 razy większego stężenia (MR97 w porównaniu do MR12K). Z kolei, uzyskanie takiego samego efektu jak najskuteczniejsza pochodna MR95, było możliwe przy zastosowaniu ponad 39 razy większego stężenia. Obserwowana wysoka aktywność pochodnych MR95, MR96, MR5K3, MR12K wobec komórek nowotworowych jest związana z występowaniem w ich strukturze atomu fluoru, który istotnie zmienia parametry fizykochemiczne, wpływając na zwiększenie lipofilowości oraz obniżenie pKa cząsteczki [294]. Ponadto, wprowadzenie fluoru do cząsteczki może poprawić jej stabilność metaboliczną, a także zazwyczaj zwiększa powinowactwo wiązania z docelowymi białkami [295]. Kolejnym ciekawym analogiem jest pochodna MR3K3, która charakteryzuje się najwyższą aktywnością wobec komórek ze zmienionym statusem białka p53. Obserwowano dla niej ponad 16-krotnie większą skuteczność wobec HCT116 p53^{-/-} niż wobec komórek typu dzikiego. Wyliczone wartości IC_{50} wynosiły 0,065 μM dla linii HCT116 p53^{-/-} oraz 0,046 μM dla linii komórek glejaka U-251, z mutacją punktową w sekwencji białka p53. Z kolei, jej analog MR9K2 z dołączoną grupą nitrową wykazywał ponad 23-krotnie większą skuteczność wobec linii HCT116 p53^{-/-} niż typu dzikiego. Jednakże, wobec linii U-251 był słabo aktywny. Co więcej, MR3K3 wykazywał 2-krotnie wyższą skuteczność wobec komórek linii MCF-7 niż jego

halogenowane analogi. Jednakże, pochodna ta obok MR5K3 wykazywała również wysoką toksyczność wobec prawidłowych komórek ludzkich fibroblastów. Pozostałe pochodne z tej serii charakteryzują się dość wysoką selektywnością wobec komórek prawidłowych. Na szczególną uwagę zasługuje pochodna MR12K, która odznaczała się wysokim indeksem terapeutycznym 209 dla linii komórek HCT116 p53^{+/+}, 231 dla HCT116 p53^{-/-} oraz 270 dla MCF-7. Również, w przypadku linii raka piersi, pochodne MR95-97 posiadały wysoki indeks terapeutyczny. W porównaniu ze związkiem MS179 dla którego aktywność wobec komórek HCT116 oraz NHDF została opisana w pracy [296], nowe analogi odznaczały się o wiele wyższą skutecznością wobec komórek z nokautem genu TP53. Ponadto dla pochodnej MS179 wykonano dodatkowe oznaczenie wobec komórek raka piersi stosując model 96-godzinny. Obliczona wartość IC₅₀ dla tej linii komórkowej wynosiła 0,219, a zarazem była wyższa niż większości nowo zsyntezowanych pochodnych MR wobec komórek linii MCF-7.

Tabela. 1 Aktywność biologiczna pochodnych TSC opartych na chinolinie



Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC ₅₀ [μM]					
		HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}	MCF-7	U-251	Hs 683	NHDF
MR29		0,5568 ± 0,1427	0,4258 ± 0,0337	0,2288 ± 0,1089	0,1831 ± 0,0557	6,326 ± 1,612	>25
MR34		18,31 ± 0,92	5,848 ± 0,4505	-	-	-	13,06 ± 1,9
MR95		0,1393 ± 0,0131	0,0663 ± 0,0186	0,0657 ± 0,0178	0,1691 ± 0,0169	0,2170 ± 0,0556	12,09 ± 0,61
MR96		0,1833 ± 0,0371	0,1377 ± 0,0499	0,0714 ± 0,0210	0,1321 ± 0,0393	0,2669 ± 0,0635	16,66 ± 5,57
MR97		0,1596 ± 0,0535	0,1541 ± 0,0631	0,0777 ± 0,0136	0,4692 ± 0,0507	8,517 ± 2,139	14,74 ± 0,79

MR3K3		1,100 ± 0,335	0,0650 ± 0,0041	0,0313 ± 0,0138	0,0463 ± 0,0119	0,2826 ± 0,0927	0,2825 ± 0,0502
MR5K3		0,2816 ± 0,0542	0,0696 ± 0,0015	0,0774 ± 0,0127	0,1222 ± 0,0361	0,3041 ± 0,0860	0,1426 ± 0,0212
MR9K2		5,096 ± 1,787	0,2221 ± 0,0185	0,3107 ± 0,0857	5,539 ± 1,492	14,81 ± 0,72	3,223 ± 0,772
MR12K		0,1068 ± 0,0427	0,0967 ± 0,0046	0,0827 ± 0,0223	0,1679 ± 0,0452	0,3230 ± 0,0845	22,34 ± 1,36
MS179 ^a		0,0877 ± 0,0439	0,48 ± 0,15	0,2190 ± 0,0151	-	-	9,44 ± 3,84

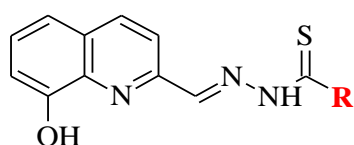
^a Oznaczenia na liniach HCT116 oraz NHDF po 96-godzinnej aplikacji z badanymi pochodnymi TSC zostały przeprowadzone przez dr Annę Mrozek-Wilczkiewicz i stanowiły przedmiot jej rozprawy doktorskiej [296].

Wyniki dla kolejnej kongenerycznej grupy pochodnych 8-hydroksychinoliny przedstawiono w tabeli 2. W poprzednich pracach, zaprojektowano i otrzymano sporą grupę pochodnych z fragmentem 8-hydroksychinoliny, którą opisano głównie pod kątem działania antyproliferacyjnego względem komórek raka jelita grubego linii HCT116 [259,285,296]. Związki takie wykazywały interesujące właściwości antyproliferacyjne, jednakże synteza takich układów jest znacznie trudniejsza z uwagi na reaktywność grupy 8-OH. Z tego względu do oznaczeń uzyskano jedynie MR27 jako nową pochodną – z dołączoną grupą nitrową do terminalnego pierścienia aromatycznego. Analiza cytotoksyczności wobec obu linii komórek HCT116, ujawniła słabą aktywność biologiczną tej pochodnej. W porównaniu z jej analogiem MR9K2 opartym na fragmencie chinoliny, osiągnięcie tego samego efektu było możliwe dopiero przy zastosowaniu ponad 2 razy większego stężenia w przypadku linii HCT116 p53^{+/+}, oraz ponad 38 razy większego stężenia w przypadku linii z nokautem genu TP53. Z tego, też względu zaniechano dalszych oznaczeń na innych badanych liniach nowotworowych. Warto jednak zauważyć, że w odróżnieniu od analogu w serii chinoliny, MR27 wykazywał niską toksyczność wobec komórek prawidłowych fibroblastów. Ponadto, przeprowadzono dodatkową charakterystykę dwóch najbardziej obiecujących pochodnych MS wobec komórek raka piersi, utrzymując jednak model 96-godzinny dla spójności wyników¹. W przypadku

¹ Różnice pomiędzy tymi dwoma modelami omówiono dokładniej na stronach 66-67

po pochodnej MS168 zawierającej w swej strukturze fragment morfoliny, obserwowano jedną z najwyższych aktywności biologicznych wśród wszystkich badanych analogów w tej pracy. Wyliczona wartość IC_{50} wynosiła 0,011 μM . Podobny choć nieco mniejszy poziom aktywności wykazywała pochodna MS181. Obie pochodne ze względu na niską toksyczność wobec komórek prawidłowych wykazywały wysoki indeks terapeutyczny. W przypadku linii MCF-7 wyniósł on odpowiednio - 976 oraz - 377. Najwyższy indeks terapeutyczny (2800 dla komórek linii HCT116 typu dzikiego) wśród badanych związków wykazywała pochodna z fragmentem morfoliny.

Tabela. 2 Aktywność biologiczna pochodnych TSC opartych na 8-hydroksychinolinie

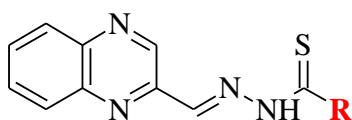


Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC_{50} [μM]					
		HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}	MCF-7	U-251	Hs 683	NHDF
MR27		11,69 \pm 1,77	8,415 \pm 1,328	-	-	-	>25
MS168 ^a		0,0038 \pm 0,0015	0,0167 \pm 0,0055	0,0109 \pm 0,0029	-	-	10,64 \pm 3,48
MS181 ^a		0,0505 \pm 0,0028	5,01 \pm 2,55	0,0322 \pm 0,0069	-	-	12,14 \pm 3,58

^a Oznaczenia na liniach HCT116 oraz NHDF po 96-godzinnej aplikacji z badanymi pochodnymi TSC zostały przeprowadzone przez dr Annę Mrozek-Wilczkiewicz i stanowiły przedmiot jej rozprawy doktorskiej [296].

Interesujące aktywności uzyskane dla niektórych pochodnych chinoliny zainspirowały syntezę ich analogów opartych na strukturze chinoksaliny. Dodatkowy atom azotu w pierścieniu heteroaromatycznym może znacząco modyfikować zdolność do kompleksowania jonów. Otrzymane związki wraz z wartościami IC_{50} , zostały przedstawione w tabeli 3.

Tabela. 3 Aktywność biologiczna pochodnych TSC opartych na chinoksalinie



Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC ₅₀ [μM]					
		HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}	MCF-7	U-251	Hs 683	NHDF
MR4K4		1,064 ± 0,1442	0,2934 ± 0,0790	0,5047 ± 0,1421	1,186 ± 0,3202	3,620 ± 1,163	21,34 ± 1,34
MR6K2		5,468 ± 1,192	6,267 ± 1,95	-	-	-	>25
MS187 ^a		3,92 ± 0,74	2,24 ± 1,47	-	-	-	9,61 ± 0,90

^a Oznaczenia na liniach HCT116 oraz NHDF po 96-godzinnej aplikacji z badanymi pochodnymi TSC zostały przeprowadzone przez dr Annę Mrozek-Wilczkiewicz i stanowiły przedmiot jej rozprawy doktorskiej [296].

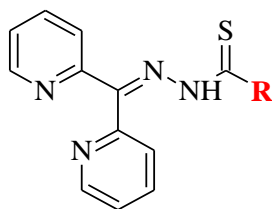
Spośród dwóch nowo zsyntezowanych związków, bardziej aktywna okazała się pochodna MR4K4 z dołączonymi atomami chloru do terminalnego pierścienia aromatycznego. Szczególnie wysoką aktywność MR4K4 obserwowano w stosunku do linii z unieczynnionym genem TP53 (IC₅₀ = 0,293 μM). Porównując, aktywność biologiczną z komórkami typu dzikiego, wykazano ponad 3,5-krotnie wyższą skuteczności MR4K4 wobec mutantów. Warto zauważyć, że związek ten wykazywał znacznie wyższy poziom aktywności biologicznej wobec obu komórek linii HCT116 niż jego niepodstawiony analog MS187 (związek referencyjny). Pochodna MR4K4 charakteryzowała się wysoką aktywnością antyproliferacyjną wobec komórek raka piersi. Jednakże, porównując go z MR97 opartym na fragmencie chinoliny, można zauważyć ponad 7-krotnie słabszą skuteczność wobec komórek linii MCF-7. Z drugiej strony, pochodna oparta na fragmencie chinoksaliny osiągała znacznie lepszą aktywność wobec komórek glejaka Hs 683. Związek MR6K2 należący do tej serii, ze względu na swoje umiarkowane właściwości antyproliferacyjne został scharakteryzowany tylko wobec komórek linii HCT116. Jak wcześniej podkreślono, ze względu na rozbudowaną bibliotekę związków, dodatkowe oznaczenia przeprowadzono tylko dla pochodnych wysoce aktywnych (IC₅₀ < 1 μM). W stosunku do swojego analogu z grupy pochodnych opartych na chinolinie (MR3K3),

wykazuje o wiele słabszą aktywność biologiczną wobec komórek nowotworowych. Co ciekawe, obie nowo zsyntezowane pochodne należące do badanej serii wykazują niską toksyczność wobec komórek prawidłowych.

Kolejną grupą badanych związków są pochodne oparte na ketonie di-2-pirydylowym, dla których wyniki przedstawiono w tabeli 4. Związkiem referencyjnym dla tej grupy pochodnych jest Dp44mT, który oznacza się wysoką aktywnością antyproliferacyjną w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* [82,100,275]. Nowe analogi należące do tej grupy otrzymano poprzez substitucję terminalnego atomu azotu pierścieniem piperazyny. Wszystkie związki odznaczały się wysoką aktywnością biologiczną wobec badanych linii komórek nowotworowych. Wyjątek stanowiła pochodna MR19 zawierająca w swej strukturze grupę nitrową, która okazała się znacząco mniej skuteczna wobec linii HCT116 p53^{+/+}, dla której wyliczona wartość IC₅₀ wynosiła 3,2 µM. Obecność grupy nitrylowej w tej samej pozycji pierścienia aromatycznego w przypadku pochodnej MR31, skutkowała ponad 14-krotnym zwiększeniem aktywności biologicznej wobec tych komórek. Ponadto, pochodna ta była wysoce aktywna wobec komórek linii MCF-7, gdzie wyliczona wartość IC₅₀ wynosiła 0,034 µM. Interesujący jest wpływ TSC należących do tej grupy na aktywność biologiczną wobec komórek raka jelita grubego z nokautem genu TP53. Szczególnie, dla pochodnych MR18, MR19 oraz MR31 obserwowano od 12 do 22 razy większą skuteczność wobec HCT116 p53^{-/-} niż wobec komórek typu dzikiego. Pochodna MR18 zawierająca w swej strukturze dwa atomy chloru okazała się również najaktywniejsza w tej grupie wobec obu linii komórek glejaka - U-251 oraz Hs 683. Co ciekawe, odmienna sytuacja miała miejsce w przypadku odpowiedników w seriach chinoliny oraz chinoksaliny (MR97 oraz MR4K4). Interesującym jest fakt, że wszystkie nowe pochodne z tej serii badanych analogów wykazują niską toksyczność wobec komórek prawidłowych fibroblastów. Wysoki indeks terapeutyczny obserwowano w przypadku pochodnej MR18 - 836 oraz MR31 - 666 w stosunku do komórek linii HCT116 p53^{-/-}. Z drugiej strony, efekt ten jest przeciwny do opisanych w poprzednich pracach pochodnych MS154, MS199 oraz MS200 [259,285,296]. Wymienione pochodne mimo odznaczającej się aktywności na poziomie nanomolowym wobec komórek linii HCT116, wykazywały wysoką toksyczność wobec komórek linii NHDF. Wyjątkiem jest związek referencyjny - Dp44mT, który uzyskał bardzo wysoki indeks terapeutyczny w stosunku do wszystkich badanych linii nowotworowych - 10986 (HCT116 p53^{+/+}), 2902 (HCT116 p53^{-/-}) oraz 38450 (MCF-7). Co ważne, w stosunku do ostatniej z wymienionych linii - MCF-7, pochodna Dp44mT wykazywała najwyższą aktywność antyproliferacyjną. Wyliczona wartość

IC₅₀ wynosiła 0,0004 μM. Można również zauważyć, że pozostałe pochodne MS, odznaczały się znacznie wyższym poziomem aktywności biologicznej wobec komórek raka jelita grubego niż nowo syntezowane analogi MR. Z kolei, w przypadku komórek raka piersi, różnica ta nie była tak zauważalna (Tabela 4 oraz Tabela 14).

Tabela. 4 Aktywność biologiczna pochodnych TSC opartych na ketonie di-2-pirydylowym

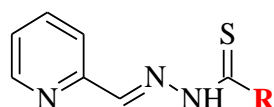


Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC ₅₀ [μM]					
		HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}	MCF-7	U-251	Hs 683	NHDF
MR18		0,3105 ± 0,0560	0,0154 ± 0,0040	0,0711 ± 0,0180	0,1511 ± 0,0417	0,1701 ± 0,034	12,87± 0,99
MR19		3,197 ± 1,321	0,1440 ± 0,0183	0,1617 ± 0,0531	0,1946 ± 0,0409	0,5604 ± 0,2754	>25
MR21		0,8447 ± 0,1944	0,1818 ± 0,0263	0,1872 ± 0,0356	0,2014 ± 0,0235	0,4508 ± 0,1933	10,30 ± 1,07
MR31		0,2272 ± 0,1504	0,0185 ± 0,0030	0,0336 ± 0,0084	0,2803 ± 0,0876	0,4762 ± 0,1927	12,32 ± 0,37
MS154 ^a		0,0008 ± 0,0001	0,0008 ± 0,0001	0,0120 ± 0,0020	-	-	0,0017 ± 0,0007
MS199 ^a		0,0021 ± 0,0009	0,0092 ± 0,0014	0,0041 ± 0,0009	-	-	0,1600 ± 0,0400
MS200 ^a		0,0378 ± 0,0031	0,0312 ± 0,0032	0,0256 ± 0,0067	-	-	0,0139 ± 0,0003
Dp44mT ^a		0,0014 ± 0,0001	0,0053 ± 0,0016	0,0004 ± 0,0001	-	-	15,38 ± 5,06

^a Oznaczenia na liniach HCT116 oraz NHDF po 96-godzinnej aplikacji z badanymi pochodnymi TSC zostały przeprowadzone przez dr Annę Mrozek-Wilczkiewicz i stanowiły przedmiot jej rozprawy doktorskiej [296].

Spośród wszystkich zbadanych serii z pojedynczym pierścieniem zdecydowanie wyróżniała się grupa pochodnych opartych na pirydyno-2-karboksyaldehdydzie. Wyniki dla trzech związków należących do tej grupy przedstawiono w tabeli 5.

Tabela. 5 Aktywność biologiczna pochodnych TSC opartych na pirydyno-2-karboksyaldehdydzie



Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC ₅₀ [μM]					
		HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}	MCF-7	U-251	Hs 683	NHDF
MR48		5,133 ± 1,235	0,2292 ± 0,0788	0,5390 ± 0,1042	0,1913 ± 0,0536	6,946 ± 3,646	>25
MR49		0,1718 ± 0,0542	0,0138 ± 0,0038	0,0150 ± 0,0057	0,0214 ± 0,0056	0,5088 ± 0,2850	>25
MR50		0,2978 ± 0,0743	0,0102 ± 0,0031	0,0206 ± 0,0056	0,0363 ± 0,0069	4,676 ± 2,860	13,28 ± 0,56
Dp44mT^a	-	0,0014 ± 0,0001	0,0053 ± 0,0016	0,0004 ± 0,0001	-	-	15,38 ± 5,06

^a Oznaczenia na liniach HCT116 oraz NHDF po 96-godzinnej aplikacji z badanymi pochodnymi TSC zostały przeprowadzone przez dr Annę Mrozek-Wilczkiewicz i stanowiły przedmiot jej rozprawy doktorskiej [296].

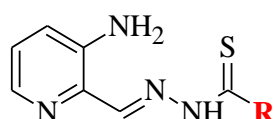
Najbardziej aktywnym związkiem w tej serii okazała się pochodna MR49, która wykazuje wysoką skuteczność wobec wszystkich badanych linii nowotworowych. W przypadku linii HCT116 typu dzikiego, wartość IC₅₀ dla tej pochodnej wynosiła 0,172 μM. Jednocześnie pochodna MR49 wykazywała wysoką selektywność wobec komórek z nokautem genu TP53, gdzie IC₅₀ wynosiło 0,014 μM, czyli ponad 12-krotnie mniej niż w przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}. Co więcej, analiza cytotoksyczności ujawniła, wysoką aktywność tej pochodnej wobec komórek linii U-251, które charakteryzowały się mutacją białka p53. Obliczona wartość IC₅₀ dla tej linii komórkowej wynosiła 0,021 μM. Porównując te dane do analogu MR5K3 z fragmentem chinoliny, obserwuje się prawie 6-krotnie wyższą skuteczność

pochodnej MR49. Podobnie, wysoką aktywnością wobec komórek U-251 charakteryzuje się pochodna MR50 z dołączoną grupą nitrową do terminalnego pierścienia aromatycznego. Wartość IC_{50} w przypadku tej linii wynosiła 0,036 μM . Pochodna ta wykazuje również wysoki poziom aktywności wobec mutantów HCT116, osiągając ponad 29-krotnie wyższą skuteczność niż w przypadku komórek typu dzikiego. Co więcej, obie pochodne MR49 i MR50 wykazują zbliżoną aktywność w stosunku do komórek raka piersi, jednak o wiele wyższą niż ich odpowiedniki w serii analogów chinolinowych (MR5K3, MR9K2). Związek MR48 wykazuje nieco mniejszą aktywność wobec badanych linii nowotworowych. W przypadku linii HCT116 typu dzikiego oraz Hs 683, pochodna MR48 wykazywała umiarkowany poziom aktywności biologicznej. W rzeczywistości, wobec linii komórek glejaka Hs 683 tylko pochodna MR49, osiąga wartość IC_{50} na poziomie 0,509 μM . Co istotne, wszystkie badane pochodne wykazywały wysoką selektywność wobec komórek prawidłowych NHDF. Dla pochodnej MR49 wyliczony indeks terapeutyczny wynosił 1812 dla komórek HCT116 p53^{-/-}, 1667 dla MCF-7 oraz 1168 dla U-251. Z kolei, pochodna MR50 bardzo wysoki indeks terapeutyczny (1302) osiąga dla linii komórek raka jelita grubego z nokautem genu TP53. Ponadto, pochodne należące do tej grupy związków wykazują niższy poziom aktywności biologicznej w porównaniu do związku referencyjnego - Dp44mT zawierającego fragment di-pirydylowy (Tabela 5 oraz Tabela 14). Zatem, można wysunąć ogólny wniosek, że brak jednej grupy pirydylowej w strukturze TSC powoduje obniżenie aktywności antyproliferacyjnej wobec badanych linii nowotworowych.

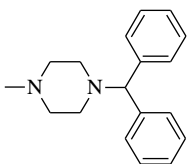
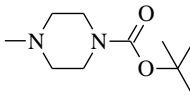
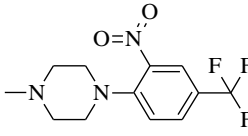
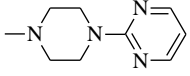
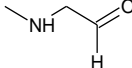
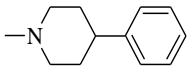
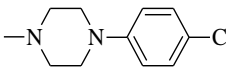
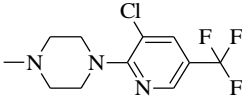
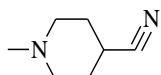
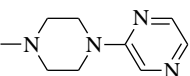

Kolejną badaną serią była grupa pochodnych 3-aminopirydyno-karboksyaldehydu. Związkiem referencyjnym dla tej grupy jest Triapina, pierwszy inhibitor RR, który ukończył II fazę badań klinicznych. Liczne badania literaturowe wskazują, że α -N-heterocykliczne pochodne TSC charakteryzują się zdolnością do chelatowania jonów Fe^{3+} oraz tworzenia z nimi kompleksów, które w wyniku redukcji tworzą ROS, wpływając w wysokim stopniu na zdolność katalityczną enzymu RR [297]. Przewiduje się, że nowe analogi 3-AP mogą charakteryzować się podobnym mechanizmem działania jak wcześniej analizowane pochodne TSC. Warto bowiem zauważyć że, mechanizm działania wysoce aktywnych pochodnych di-pirydylowych, takich jak Dp44mT, opiera się głównie na generowaniu cytotoksycznych ROS po związaniu z różnymi jonami metali oraz zatrzymaniu cyklu komórkowego. Bezpośrednia inhibicja RR odgrywa mniejszą rolę. Nowe analogi 3-AP zostały otrzymane głównie poprzez zastąpienie niepodstawionej grupy NH_2 fragmentem piperazyny. Ideą tej modyfikacji było polepszenie aktywności biologicznej nowych analogów, ze względu na obecność fragmentu piperazyny,

który jest znanym farmakoforem, występującym w wielu aktywnych związkach, niektórych stosowanych w badaniach klinicznych [298–301]. Poprzez substytucję terminalnego atomu azotu, oczekiwane jest polepszenie profilu farmakologicznego nowych analogów 3-AP. Wyniki aktywności biologicznej dla tej grupy przedstawiono w tabeli 6.

Tabela. 6 Aktywność biologiczna pochodnych TSC opartych na 3-aminopirydino-karboksyaldehydzie



Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC ₅₀ [μM]					
		HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}	MCF-7	U-251	Hs 683	NHDF
MR160		0,526 ± 0,077	0,152 ± 0,0744	0,360 ± 0,111	0,887 ± 0,158	2,487 ± 0,512	>25
MR166		1,328 ± 0,209	0,185 ± 0,088	0,424 ± 0,149	0,649 ± 0,170	4,457 ± 0,954	>25
MR167		1,524 ± 0,445	0,128 ± 0,012	0,532 ± 0,145	0,403 ± 0,090	1,436 ± 0,358	>25
MR169		1,450 ± 0,452	0,7461 ± 0,354	3,807 ± 1,023	2,569 ± 0,675	10,050 ± 2,643	>25
MR170		1,457 ± 0,195	0,529 ± 0,039	1,272 ± 0,140	2,046 ± 0,689	0,843 ± 0,152	>25
MR171		0,644 ± 0,137	1,106 ± 0,440	12,320 ± 3,869	0,968 ± 0,234	1,530 ± 0,414	>25
MR172		1,856 ± 0,73	2,121 ± 0,9185	-	-	-	>25
MR174		0,422 ± 0,113	0,123 ± 0,061	0,204 ± 0,024	0,277 ± 0,058	0,844 ± 0,238	>25
MR193		1,900 ± 0,292	0,139 ± 0,020	1,120 ± 0,113	1,070 ± 0,280	1,162 ± 0,307	>25

MR203		0,308 ± 0,022	0,478 ± 0,033	0,316 ± 0,059	0,360 ± 0,095	0,690 ± 0,261	>25
MR231		0,762 ± 0,238	1,133 ± 0,049	2,536 ± 0,400	3,084 ± 1,273	4,624 ± 1,031	>25
MR232		0,139 ± 0,016	0,270 ± 0,007	0,470 ± 0,097	0,381 ± 0,042	1,894 ± 0,812	>25
MR233		0,668 ± 0,045	0,650 ± 0,055	1,730 ± 0,388	1,268 ± 0,374	2,838 ± 0,581	>25
MR234		>25	>25	-	-	-	-
MR235		0,140 ± 0,016	0,277 ± 0,009	0,225 ± 0,038	0,295 ± 0,029	6,521 ± 1,483	>25
MR236		0,120 ± 0,005	0,167 ± 0,018	0,204 ± 0,049	0,128 ± 0,012	1,483 ± 0,335	>25
MR237		0,170 ± 0,015	0,159 ± 0,011	0,258 ± 0,040	0,137 ± 0,016	0,195 ± 0,021	>25
MR238		0,345 ± 0,117	0,528 ± 0,044	0,932 ± 0,340	1,073 ± 0,231	2,119 ± 0,654	>25
MR242		0,435 ± 0,108	0,342 ± 0,042	2,218 ± 0,638	0,743 ± 0,109	2,595 ± 0,237	>25
Triapina (3-AP)		1,121 ± 0,277	1,336 ± 0,338	2,328 ± 0,431	1,476 ± 0,558	1,763 ± 0,292	>25

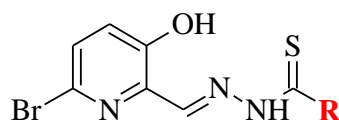
Zdecydowana większość badanych analogów wykazała znacznie wyższą aktywność antyproliferacyjną niż wyjściowa Triapina. Najbardziej aktywnym związkiem w tej serii okazała się pochodna MR236, której wartość IC_{50} wynosiła 0,12 μ M w przypadku linii komórkowej HCT116 p53^{+/+}. Podobnie wysoką aktywność obserwowano wobec komórek raka piersi (0,204 μ M), a także linii nowotworowych, posiadających zmieniony status białka p53. Wyliczone wartości IC_{50} wynosiły 0,167 μ M dla linii z nokautem genu TP53 oraz 0,128 μ M

dla linii komórek glejaka (U-251) z mutacją punktową w sekwencji białka p53. Ta pochodna również odznaczała się wysokim indeksem terapeutycznym, który wynosił 208 dla linii komórkowej HCT116 p53^{+/+} oraz 195 dla linii U-251. Te wartości wynikają z niskiej toksyczności MR236 wobec linii komórek prawidłowych przy wysokiej aktywności antyproliferacyjnej wobec komórek nowotworowych. Jedynym wyjątkiem w przypadku pochodnej MR236 jest linia komórek Hs 683, ponieważ osiągnięcie tego samego efektu cytotoksycznego jak przy linii U-251, było możliwe dopiero przy zastosowaniu ponad 10 razy większego stężenia. W rzeczywistości linia Hs 683 wykazywała oporność na prawie wszystkie badane analogi należące do tej grupy. Tylko dla pochodnych MR170, MR174, MR203 oraz MR237 wyliczony parametr IC₅₀ osiągał wartość w zakresie 0,2 µM - 0,85 µM. Analogi te, za wyjątkiem MR170 były również wysoce aktywne wobec wszystkich badanych linii nowotworowych. Analizując dane dla tej grupy pochodnych, można wyciągnąć ogólny wniosek, że ligandy halogenowane na terminalnym pierścieniu aromatycznym (MR160, MR236) wykazały znacznie wyższą aktywność niż ich niepodstawiony odpowiednik (MR167). Co więcej, można zauważyć, że związki zawierające w swojej strukturze diazyny (MR233 oraz MR242) wykazywały podobny, choć nieco mniejszy, poziom aktywności jak MR167 zawierający grupę fenyłową. Co ciekawe, obecność w pierścieniu tylko jednego atomu azotu jak w przypadku pochodnej pirydyny MR193 skutkuje zmniejszeniem aktywności biologicznej. Podobnie, jak w opisanych wcześniej seriach, można zauważyć, że pochodne TSC zawierające w swej strukturze układ trifluorometylowy (MR174, MR232, MR237) odznaczają się wysoką aktywnością antyproliferacyjną wobec wszystkich badanych komórek nowotworowych. Kolejnym ciekawym analogiem jest pochodna MR235 zawierająca w swojej strukturze fragment piperydyny, charakteryzująca się podobną, nieznacznie mniejszą aktywnością od MR236 wobec obu linii HCT116, MCF-7 oraz U-251. Co ciekawe, jej analog MR238 z dołączoną grupą nitrylową wykazuje ok. 2-4 razy mniejszą skuteczność wobec komórek linii HCT116, MCF-7 oraz U-251. Odminną sytuację obserwuje się w przypadku linii Hs 683, gdzie aktywność tej pochodnej jest 3-krotnie wyższa niż MR235. Wśród nowo zsyntezowanych TSC tej grupy znajdują się również pochodne otrzymane w wyniku dołączenia grupy alkilowej lub etanalowej do terminalnego końca NH₂ Triapiny. W przypadku pochodnej MR171 obecność grupy metylowej oraz atomu wodoru na terminalnym atomie azotu prowadzi do ponad 1,5-krotnego zwiększenia aktywności antyproliferacyjnej wobec komórek HCT116 p53^{+/+} oraz U-251, w porównaniu do Triapiny. Z drugiej strony, w przypadku komórek raka piersi obserwowano znaczne zmniejszenie aktywności. Pochodna MR172 z grupą etylową wykazywała mniejszą skuteczność niż Triapina, a dodatkowo wprowadzenie grupy etanalowej

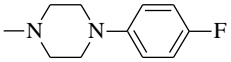
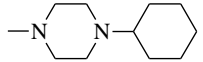
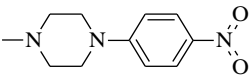
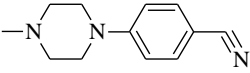
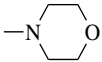
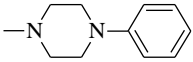
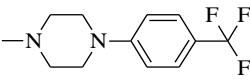
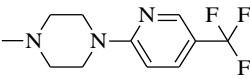
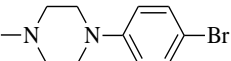
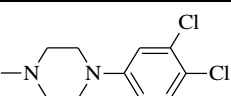
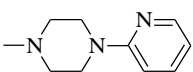
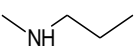
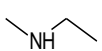
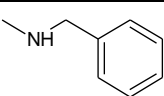

(MR234) skutkowało utratą aktywności wobec komórek nowotworowych. Można więc zaryzykować stwierdzenie, że rozbudowa terminalnego końca łańcucha alifatycznego ma istotny wpływ na aktywność pochodnych z tej serii. Szczególnie, interesujący jest wpływ TSC należących do tej grupy na komórki raka jelita grubego z nokautem genu TP53. Dla pochodnych MR166, MR167, MR169, MR170 oraz MR193 obserwowano od 2 do 14 razy większą skuteczność wobec HCT116 p53^{-/-} niż wobec komórek typu dzikiego. Z kolei, odwrotną sytuację zanotowano dla pochodnych MR171 oraz MR231. Podsumowując, analiza danych cytotoksyczności, pozwala na wysunięcie ogólnego wniosku, że komórki raka jelita grubego, piersi oraz glejaka U-251 wydają się być w podobnym stopniu wrażliwe na działanie pochodnych z tej serii. Wyjątek stanowi linia komórek glejaka Hs 683, która jest szczególnie oporna wobec analogów należących tej grupy. Jest to szczególnie interesujące, ze względu na podobne pochodzenie obu badanych linii komórek glejaka. Możliwego wyjaśnienia tego fenomenu najprawdopodobniej należy upatrywać w zmienionej homeostazie żelaza i różnej ekspresji receptorów transferryny w obu tych liniach. Zwłaszcza, że ostatnie badania wskazały na większą oporność linii Hs 683 na działanie toksyn Tf, w porównaniu do U-251 [302].

Obok modyfikacji fragmentu tiomocznikowego w szkielecie Triapiny przeprowadzono również zmiany w obrębie pierścienia 3-aminopirydyny. Wprowadzenie atomu bromu w pozycji 6 i wymiana grupy aminowej na grupę hydroksylową powinna znacząco wpłynąć na możliwości kompleksowania jonów żelaza. Wyniki dla serii związków opartych o 6-bromo-3-hydroksypirydino-karboksyaldehdyde przedstawiono w tabeli 7.

Tabela. 7 Aktywność biologiczna pochodnych TSC opartych na 6-bromo-3-hydroksypirydino-karboksyaldehdydzie



Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC ₅₀ [μM]		
		HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}	NHDF
MR36		7,99 ± 1,72	2,60 ± 0,33	15,62 ± 0,92

MR37		$4,38 \pm 1,97$	$1,73 \pm 0,63$	$12,07 \pm 2,83$
MR38		$13,16 \pm 1,54$	$6,00 \pm 0,40$	$21,51 \pm 3,02$
MR39		$6,57 \pm 4,56$	$2,97 \pm 1,41$	$17,03 \pm 3,76$
MR45		$5,30 \pm 1,33$	$1,41 \pm 0,43$	>25
MR46		$19,24 \pm 2,94$	$7,76 \pm 1,57$	>25
MR47		$8,03 \pm 1,23$	$2,25 \pm 0,87$	$19,93 \pm 2,81$
MR90		$4,76 \pm 0,78$	$1,92 \pm 0,31$	$14,48 \pm 0,79$
MR91		$4,00 \pm 0,62$	$3,37 \pm 0,60$	>25
MR92		$4,58 \pm 0,45$	$2,26 \pm 0,49$	$18,53 \pm 5,2$
MR93		$5,38 \pm 0,63$	$3,25 \pm 0,53$	>25
MR94		$9,56 \pm 1,09$	$3,56 \pm 0,17$	>25
MR137		>25	>25	-
MR138		>25	>25	-
MR139		>25	>25	-
Triapina (3-AP)		$1,121 \pm 0,277$	$1,336 \pm 0,338$	>25

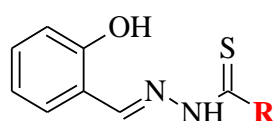
Jak można zauważyć, modyfikacja struktury TSC doprowadziła do znacznego spadku aktywności biologicznej wobec komórek linii HCT116 p53^{+/+} oraz HCT116 p53^{-/-}. Istotnym

porównaniem może być cytotoksyczność jednej z najbardziej aktywnych pochodnych tej serii związków MR37 z jej analogiem MR160 opartym na 3-aminopirydino-karboksyaldehydzie. Wartość IC_{50} dla MR37 wynosiła 4,38 μM oraz 1,73 μM , odpowiednio dla linii komórek raka jelita grubego typu dzikiego oraz mutantów z nokautem genu TP53. Z kolei, dla MR160 obserwowano ponad 8-krotnie wyższą aktywność wobec komórek HCT116 p53^{+/+} oraz ponad 11-krotnie względem HCT116 p53^{-/-}. Ponadto ocena cytotoksyczności dla tej grupy pochodnych, ujawniła 2-4 razy większą skuteczność wobec komórek ze zmienionym statusem p53. Podobnie, jak w przypadku pozostałych serii związków, można wnioskować, że obecność grup halogenowych w strukturze TSC polepsza właściwości biologiczne. Warto, również zauważyć, że wśród tego szeregu analogów, obecność grupy etylowej, propylowej lub etylobenzenu oraz wodoru na terminalnym atomie azotu (pochodne MR137-139) skutkuje utratą aktywności biologicznej wobec obu linii HCT116. Interesującym wydaje się fakt, że pochodne należące do tej grupy wykazywały nieco mniejszą selektywność wobec komórek prawidłowych NHDF, niż ich analogi oparte na 3-aminopirydino-karboksyaldehydzie. Można więc stwierdzić, że zaproponowane modyfikacje w obrębie pierścienia pirydyny prowadzą do spadku zarówno aktywności, jak i selektywności. Najprawdopodobniej przyczyną takiego stanu rzeczy jest utrata cech kluczowych dla mechanizmu działania. Zmodyfikowane związki wywołują prawdopodobnie niespecyficzne uszkodzenia prowadzące do ogólnej destabilizacji i śmierci komórki.

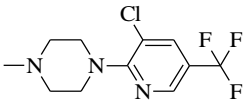
Kolejną analizowaną serią z pojedynczym pierścieniem była grupa pochodnych fenolu. Wyniki przedstawiono w tabeli 8. Prawie wszystkie pochodne z tej serii wykazywały słabą aktywność biologiczną wobec komórek raka jelita grubego typu dzikiego. Wyjątkiem jest pochodna MR12K2, która wykazywała umiarkowany poziom aktywności, a wyliczona dla niej wartość IC_{50} wynosiła 8,2 μM . Znacznie wyższą aktywność ta pochodna prezentowała wobec komórek z unieczynnionym genem TP53. Porównując, aktywność biologiczną z komórkami typu dzikiego, wykazano prawie 3,5-krotnie większą skuteczność MR12K2 wobec mutantów. Co więcej, dla pozostałych fluorowcowanych pochodnych MR99, MR5K2, MR11K2 obserwowano wzrost poziomu aktywności wobec komórek linii HCT116 p53^{-/-}, a wyliczony dla nich parametr IC_{50} osiągał wartość w zakresie 5 do 12 μM . Analizując te dane, można wyciągnąć ogólny wniosek, że obecność atomu fluoru związana jest z polepszeniem aktywności antyproliferacyjnej wobec mutantów p53. Ciekawym analogiem w tej grupie wydaje się być pochodna MR11K2 zawierająca w swej strukturze fragment tiomorfoliny. Jak wykazała analiza cytotoksyczności pochodna ta charakteryzuje się praktycznie brakiem

aktywności wobec komórek HCT116 p53^{+/+}, przy zachowaniu umiarkowanej skuteczności wobec komórek linii HCT116 p53^{-/-}. Podobny, nieco mniejszy wzrost aktywności wobec mutantów obserwowano dla pochodnej MR30 zawierającej w swej strukturze grupę nitylową. Podsumowując, na podstawie wyników z kilku badanych serii analogów, można wnioskować, że obecność heteroatomu może mieć istotny wpływ na aktywność pochodnych TSC.

Tabela. 8 Aktywność biologiczna pochodnych TSC opartych na fenolu

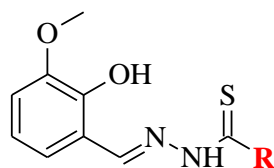


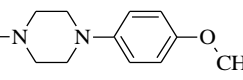
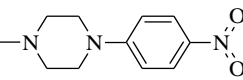
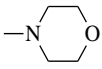
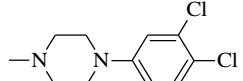
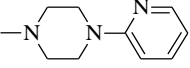
Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC ₅₀ [μM]		
		HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}	NHDF
MR30		15,87 ± 5,97	8,33 ± 1,37	>25
MR69		>25	16,57 ± 1,04	>25
MR99		>25	11,69 ± 3,71	>25
MR100		20,96 ± 2,95	19,35 ± 3,15	>25
MR104		24,79 ± 0,20	8,95 ± 4,96	>25
MR110		>25	>25	-
MR3K2		15,25 ± 2,78	10,85 ± 1,31	-
MR5K2		10,93 ± 3,31	5,00 ± 1,13	-
MR11K2		23,21 ± 2,15	6,57 ± 3,63	-



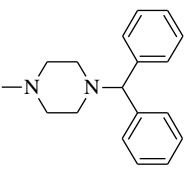
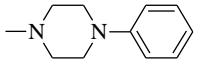
MR12K2		$8,20 \pm 0,78$	$2,35 \pm 0,44$	-
--------	---	-----------------	-----------------	---

Kolejną serią badanych analogów jest grupa pochodnych TSC opartych na 2-metoksyfenolu. Wyniki aktywności biologicznej wobec komórek raka jelita grubego oraz prawidłowych fibroblastów przedstawiono w tabeli 9. Jak wykazała analiza cytotoksyczności, dołączenie grupy metoksy do pierścienia fenolu skutkowało utratą aktywności biologicznej przez pochodne należące do tej serii analogów. Jedynym wyjątkiem jest pochodna MR101 zawierająca w swej strukturze dwa atomy chloru dołączone do terminalnego pierścienia aromatycznego. Pochodna ta wykazuje słabą aktywność wobec obu badanych linii nowotworowych, a wyliczona dla niej wartość IC_{50} wynosi 11-12 μM . Ponadto, pochodna ta nie wykazuje toksyczności wobec komórek prawidłowych.

Tabela. 9 Aktywność biologiczna pochodnych TSC opartych na 2-metoksyfenolu

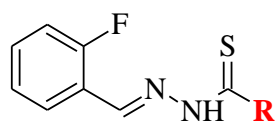


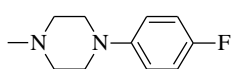
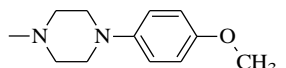
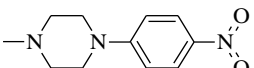
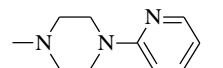
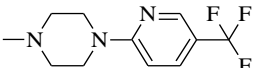
Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC_{50} [μM]		
		HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}	NHDF
MR60		>25	$21,74 \pm 1,625$	-
MR64		>25	>25	-
MR80		>25	>25	-
MR101		$12,10 \pm 1,03$	$11,15 \pm 4,03$	>25
MR105		>25	>25	-

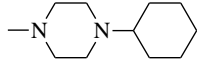
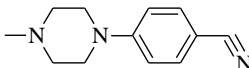
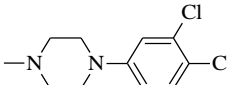
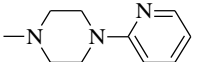
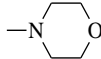


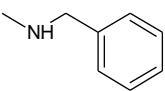
MR196		>25	>25	-
MR197		>25	>25	-
MR204		$22,55 \pm 1,36$	$20,43 \pm 1,75$	-
MR239		>25	>25	-

Kolejnymi analizowanymi seriami związków są pochodne oparte na fluorobenzenie, 1,3-difluorobenzenie oraz 1,4-difluorobenzenie. Wyniki aktywności biologicznej dla tych analogów wobec komórek raka jelita grubego przedstawiono w tabelach 10, 11 oraz 12.

Tabela. 10 Aktywność biologiczna pochodnych TSC opartych na fluorobenzenie



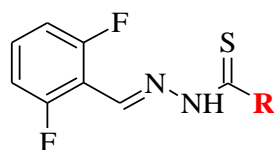
Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC ₅₀ [μM]	
		HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}
MR71		>25	>25
MR82		>25	>25
MR83		>25	>25
MR102		>25	>25
MR103		>25	>25

MR109		>25	>25
MR113		>25	>25
MR114		>25	15,83 ± 7,63
MR115		>25	>25
MR116		>25	>25
MR140		>25	>25
MR141		>25	>25
MR142		>25	>25

Wszystkie analogi należące do pochodnych fluorobenzenu nie wykazywały aktywności biologicznej względem komórek nowotworowych linii HCT116 p53^{+/+}. Z kolei, na linii z nokautem genu kodującego białko p53, tylko pochodna MR114 wykazywała niewielką aktywność biologiczną. Z kolei, pozostałe pochodne należące do tej serii odznaczały się brakiem aktywności wobec linii HCT116 p53^{-/-}. Wyjaśnieniem tego efektu, może być brak heteroatomu w pierścieniu aromatycznym, który prowadzi do utraty aktywności antyproliferacyjnej.

Dalsze modyfikacje polegające na dodaniu kolejnego atomu fluoru do pierścienia fenolu, nie poprawiają wyników aktywności. Dla wszystkich pochodnych opartych na 1,3-difluorobenzenu obserwowany jest brak aktywności wobec komórek nowotworowych jelita grubego.

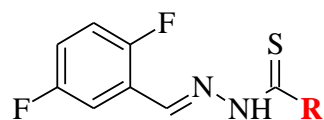
Tabela. 11 Aktywność biologiczna pochodnych TSC opartych na 1,3-difluorobenzenie



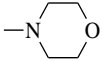
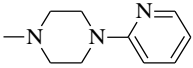

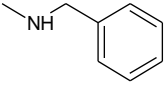
Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC ₅₀ [μM]	
		HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}
MR119		>25	>25
MR122		>25	>25
MR124		>25	>25
MR146		>25	>25
MR147		>25	>25
MR159		>25	>25

Podobnie, modyfikacje związane ze zmianą podstawienia atomów fluoru z orto na para, nie wpływają na aktywność biologiczną pochodnych tej serii wobec komórek nowotworowych.

Tabela. 12 Aktywność biologiczna pochodnych TSC opartych na 1,4-difluorobenzenie

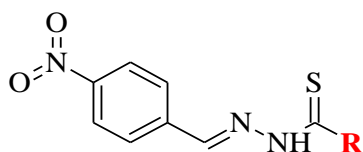


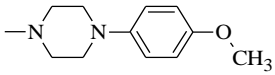
Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC ₅₀ [μM]	
		HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}
MR121		>25	>25

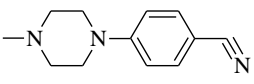

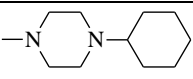
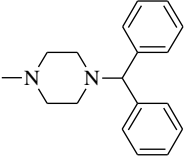

MR126		>25	>25
MR130		>25	>25
MR144		>25	>25
MR145		>25	>25

Ostatnia seria analizowanych pochodnych dotyczy analogów opartych na nitrobenzenie. Wyniki aktywności biologicznej wobec komórek linii HCT116 p53^{+/+} oraz linii z nokautem genu TP53 przedstawiono w tabeli 13. Jak wynika z przeprowadzonej analizy zdecydowana większość analogów badanej serii nie wykazuje aktywności biologicznej względem komórek nowotworowych. Jedynym związkiem wykazującym słabą aktywność wobec obu linii raka jelita grubego jest pochodna MR165. Wyliczona wartość IC₅₀ wynosiła 11,8 μM wobec komórek typu dzikiego. Z kolei, w przypadku mutantów obserwowano niewielką aktywność antyproliferacyjną. Podobnie, jak w przypadku pochodnej MR205. Najprawdopodobniej przyczyną obserwowanego braku aktywności biologicznej jest utrata możliwości chelatowania jonów metali przez analogi pozbawione układu 3-aminopirydynowego. Ugrupowanie tiosemikarbazonu nie jest wystarczające do tworzenia redoks-aktywnych kompleksów.

Tabela 13. Aktywność biologiczna pochodnych TSC opartych na nitrobenzenie

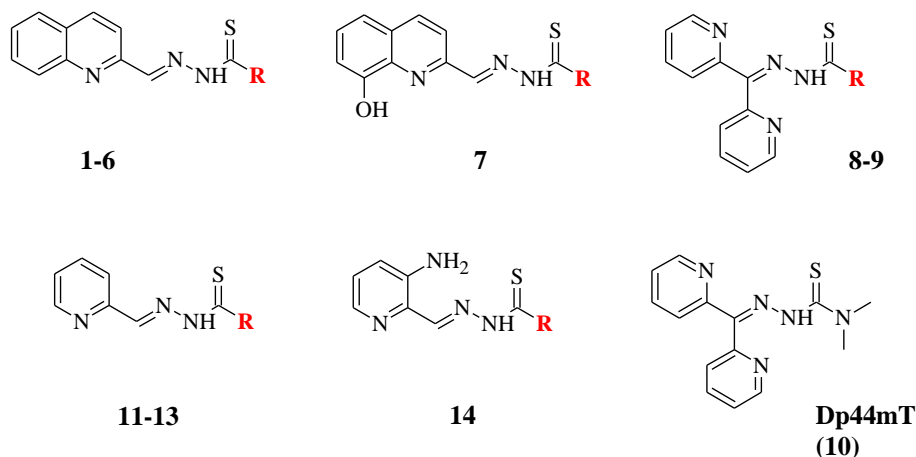


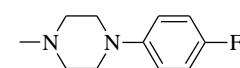
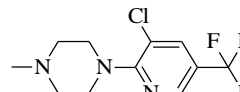
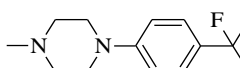
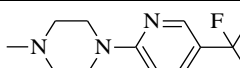
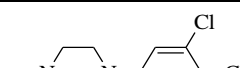
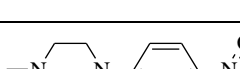
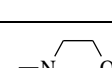
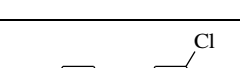
Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC ₅₀ [μM]		
		HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}	NHDF
MR75		>25	>25	-

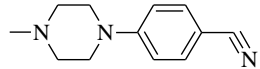
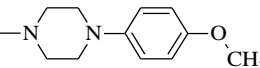
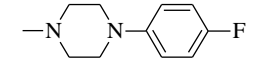
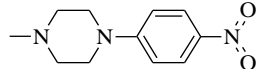
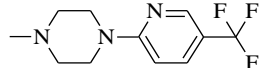
MR120		>25	>25	-
MR148		>25	>25	-
MR165		11,78 ± 3,28	20,43 ± 2,29	>25
MR205		>25	22,21 ± 0,83	-
MR206		>25	>25	-

W trakcie wcześniejszych badań z udziałem tiosemikarbazonów realizowanych przez dr Annę Mrozek-Wilczkiewicz stosowano 96-godzinny model eksperymentalny. Natomiast podczas realizacji tej pracy wybrano model 72-godzinny. Wy tłumaczeniem jest fakt, iż po 72 godzinach zostaną uruchomione wszystkie badane w późniejszym etapie ścieżki sygnałowe. Jednakże, dla ujednolicenia wyników pochodzących z obu modeli zdecydowano się na wykonanie dodatkowych oznaczeń. Na podstawie analizy cytotoxycyzności przeprowadzonej wobec komórek raka jelita grubego typu dzikiego, wyselekcjonowano 10 najbardziej aktywnych związków o kodowaniu MR należących do różnych serii analogów. Następnie przeprowadzono ponowną ocenę cytotoxycyzności wobec komórek linii HCT116 p53^{+/+} oraz MCF-7, stosując model 96-godzinny. Zestawienie otrzymanych wyników dla tych analogów oraz pochodnej MS przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Aktywność biologiczna wybranych analogów MR oraz MS po 72- i 96-godzinnej inkubacji



Lp.	Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC ₅₀ [μM]			
			72-godzinna inkubacja		96-godzinna inkubacja	
			HCT116 p53 ^{+/+}	MCF-7	HCT116 p53 ^{+/+}	MCF-7
1	MR5K3		0,2816 ± 0,0542	0,0774 ± 0,0127	0,0622 ± 0,0090	0,0314 ± 0,0034
2	MR12K		0,1068 ± 0,0427	0,0827 ± 0,0223	0,0721 ± 0,0094	0,0173 ± 0,0027
3	MR95		0,1393 ± 0,0131	0,0657 ± 0,0178	0,1078 ± 0,0083	0,0562 ± 0,0091
4	MR96		0,1833 ± 0,0371	0,0714 ± 0,0210	0,1143 ± 0,0384	0,0212 ± 0,0030
5	MR97		0,1596 ± 0,0535	0,0777 ± 0,0136	0,1204 ± 0,0280	0,0639 ± 0,0052
6	MR9K2		5,096 ± 1,787	0,3107 ± 0,0857	2,729 ± 0,256	0,2153 ± 0,0183
7	MS168		0,0073 ± 0,0012	0,0198 ± 0,0071	0,0038 ± 0,0015	0,0109 ± 0,0029
8	MR18		0,3105 ± 0,0560	0,0711 ± 0,0180	0,0959 ± 0,0041	0,0148 ± 0,0032

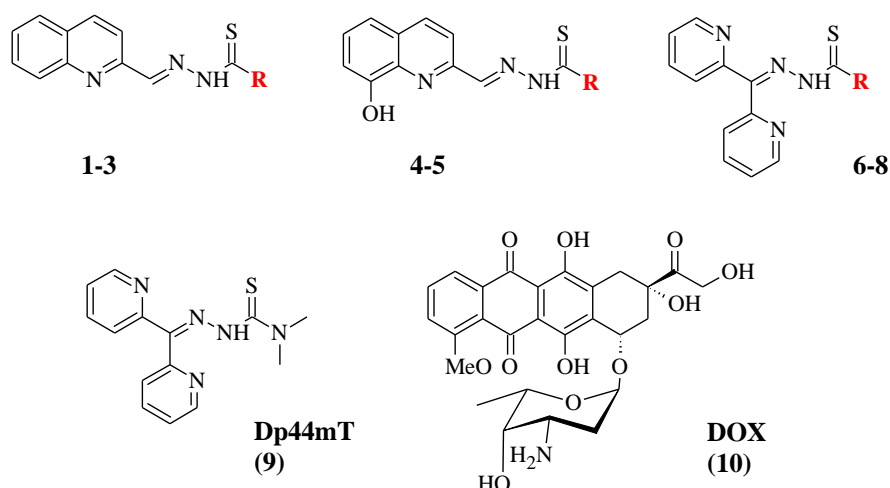
9	MR31		0,2272 ± 0,1504	0,0336 ± 0,0084	0,1110 ± 0,0074	0,0197 ± 0,0010
10	Dp44mT	-	0,0012 ± 0,0002	0,0011 ± 0,0004	0,0014 ± 0,0001	0,0004 ± 0,0001
11	MR48		5,133 ± 1,235	0,5390 ± 0,1042	2,674 ± 1,103	0,2392 ± 0,0169
12	MR49		0,1718 ± 0,0542	0,0150 ± 0,0057	0,0404 ± 0,0127	0,0081 ± 0,0040
13	MR50		0,2978 ± 0,0743	0,0206 ± 0,0056	0,0510 ± 0,0123	0,0109 ± 0,0022
14	MR174		0,422 ± 0,113	0,204 ± 0,024	0,3006 ± 0,0391	0,1022 ± 0,0141

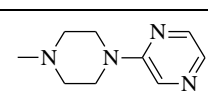
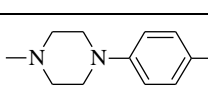
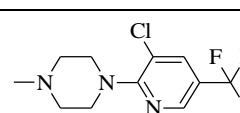

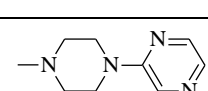
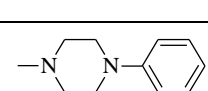
Analiza porównawcza wykazała, niewielki wzrost aktywności biologicznej dla wszystkich badanych pochodnych MR. Jednakże, wyjątek stanowią dwie pochodne należące do grupy analogów chinoliny. Po dodatkowych 24-godzinach inkubacji, w przypadku pochodnej MR5K3 obserwowano ponad 4,5-krotny wzrost aktywności biologicznej wobec komórek linii HCT116. Z kolei, dla pochodnej MR12K odnotowano prawie 5-krotnie wyższą skuteczność wobec komórek raka piersi, stosując model 96-godzinny. Analizując dane, można zaobserwować, że obie te pochodne wykazują nieco wyższy poziom aktywności wobec komórek raka jelita grubego, niż analog MS179 (porównanie do Tabeli 15). Co więcej warto zauważyć, że odmienną sytuację obserwowano w przypadku 72-godzinnej czasu inkubacji. Z kolei, w grupie pochodnych opartych na ketonie di-2-pirydylowym, widoczna jest znaczna różnica w poziomie aktywności biologicznej pomiędzy pochodnymi MR i MS wobec komórek linii HCT116 (porównanie do Tabeli 15). Co ciekawe, po unormowaniu modelu eksperymentalnego wobec linii komórek MCF-7, można zauważyć zbliżoną skuteczność pochodnych badanej serii.

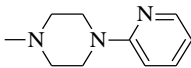
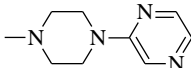
W świetle tych wyników, do dalszych szczegółowych badań nad molekularnymi mechanizmami działania pochodnych TSC oraz ich zastosowania w terapiach opartych na wywołaniu stresu oksydacyjnego, wytypowano 9 związków (Tabela 15). Pochodne te charakteryzują się największą aktywnością biologiczną wśród wszystkich przebadanych analogów w ramach przygotowywania niniejszej pracy doktorskiej. W dalszych analizach jako związek kontrolny stosowano doksorubicynę (DOX), dla której aktywność antyproliferacyjną

wobec komórek linii HCT116 p53^{+/+} oraz MCF-7 przedstawiono w tej samej tabeli. Wyboru takiego związku referencyjnego dokonano ze względu na znany mechanizm działania, który koncentruje się na generowaniu reaktywnych form tlenu oraz oddziaływaniu z endogennymi przeciwutleniaczami, co skutkuje indukcją apoptozy w komórkach [303].

Tabela 15. Aktywność biologiczna wybranych pochodnych TSC do dalszych badań nad molekularnym mechanizmem działania.



Lp.	Związek	R	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC ₅₀ [μM]	
			96-godzinna inkubacja	
			HCT116 p53 ^{+/+}	MCF-7
1	MS179		0,0877 ± 0,0439	0,2190 ± 0,0151
2	MR5K3		0,0622 ± 0,0090	0,0314 ± 0,0034
3	MR12K		0,0721 ± 0,0094	0,0173 ± 0,0027
4	MS168		0,0038 ± 0,0015	0,0109 ± 0,0029
5	MS181		0,0505 ± 0,0028	0,0322 ± 0,0069
6	MS154		0,0008 ± 0,0001	0,0120 ± 0,0020

7	MS199		$0,0021 \pm 0,0009$	$0,0041 \pm 0,0009$
8	MS200		$0,0378 \pm 0,0031$	$0,0256 \pm 0,0067$
9	Dp44mT	-	$0,0014 \pm 0,0001$	$0,0004 \pm 0,0001$
10	DOX	-	$0,091 \pm 0,007$	$0,405 \pm 0,038$

2. Badanie mechanizmu działania wybranych pochodnych tiosemikarbazonu

2.1 Wpływ jonów metali na cytotoksyczność badanych pochodnych TSC

Wybrane do dalszych badań wysoce aktywne pochodne TSC zsyntezowane zostały w oparciu o dwa fragmenty, cenne z punktu widzenia chemii medycznej oraz projektowania nowych leków. Wiele doniesień literaturowych wskazuje, że związki należące do tej klasy, zawierające w swojej strukturze fragmenty ketonu di-2-pirydylowego lub chinoliny wykazują silne działanie antyproliferacyjne, które wiąże się ze zdolnością do tworzenia redoks aktywnych kompleksów z metalami [100]. Z uwagi na to, że oba te fragmenty strukturalne są znane ze swoich właściwości do chelatowania jonów metali, a dodatkowo 8-HQ wykazuje właściwości jonoforyczne, zdecydowano się na przeprowadzenie analiz w tym zakresie. Jak już wspomniano, środki chelatujące jony metali ze względu na wewnątrzkomórkowy mechanizm działania mogą być klasyfikowane w trzech podgrupach, takich jak chelatory, transportery metali oraz jonofory [174]. Ich zdolność do wiązania metali może być zweryfikowana poprzez analizę aktywności wobec nadmiaru jonów docelowych metali lub poprzez zsyntezowanie odpowiednich związków kompleksowych. Jednakże, jak pokazują dane literaturowe, związki koordynacyjne TSC mogą wykazywać niejednoznaczną aktywność antyproliferacyjną w takich testach, co może wiązać się ze złożonym mechanizmem działania samych pochodnych tiosemikarbazonu [100,304,305].

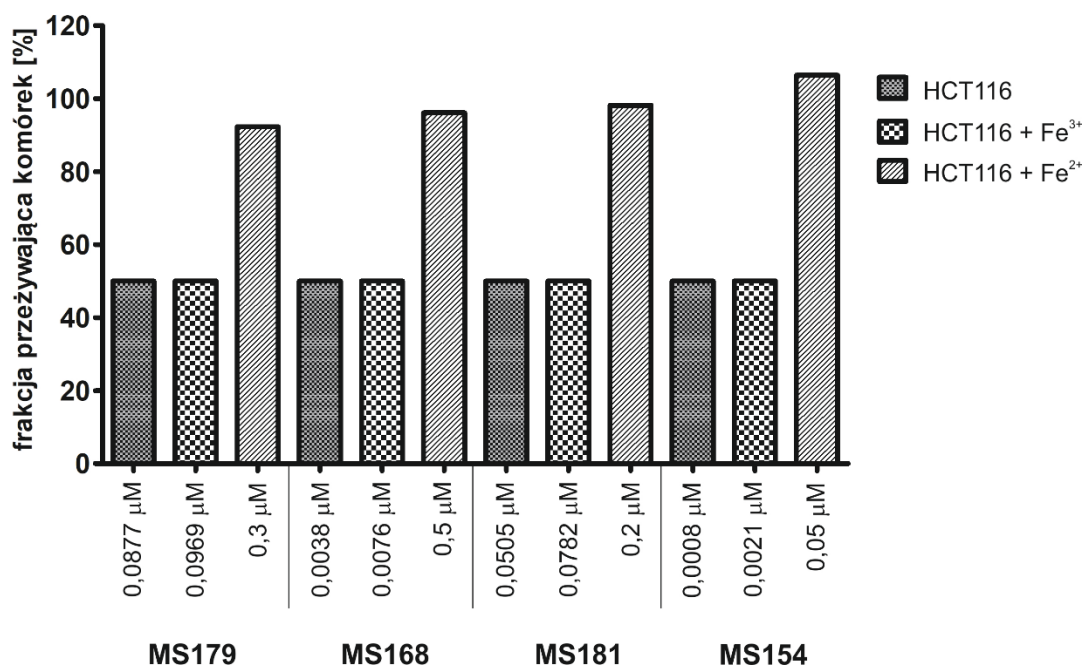
W niniejszej pracy doktorskiej, analizę cytotoksyczności wybranych pochodnych TSC w obecności jonów miedzi oraz żelaza przeprowadzono wobec komórek linii HCT116 typu dzikiego oraz MCF-7. Wybór linii komórkowych podyktowany został ich wysokim podstawowym poziomem reaktywnych form tlenu oraz zwiększoną wrażliwością na zmiany homeostazy oksydacyjno-redukcyjnej w wyniku aplikowania cytostatyków, które generują

ROS [306]. Oznaczenia wykonano przy pomocy testu MTS po traktowaniu komórek aktywnymi pochodnymi TSC, dodatkowo dodając do medium sole CuSO_4 , FeSO_4 lub FeCl_3 . Wyniki cytotoksyczności w obecności poszczególnych jonów metali przedstawiono w tabeli 16 oraz Ryc. 14.

Tabela 16. Aktywność biologiczna pochodnych TSC oraz DOX wobec komórek linii HCT116 oraz MCF-7 w obecności jonów metali

Związek	Aktywność antyproliferacyjna <i>in vitro</i> - IC_{50} [μM]							
	HCT116	HCT116 + Cu^{2+}	HCT116 + Fe^{3+}	HCT116 + Fe^{2+}	MCF-7	MCF-7 + Cu^{2+}	MCF-7 + Fe^{3+}	MCF-7 + Fe^{2+}
MS179	0,0877 \pm 0,0439	0,0596 \pm 0,0065	0,0969 \pm 0,0169	>0,3	0,2190 \pm 0,0151	0,0449 \pm 0,0038	0,2734 \pm 0,0357	>0,6
MR5K3	0,0622 \pm 0,0090	0,0197 \pm 0,0005	0,0724 \pm 0,0129	>0,1	0,0314 \pm 0,0034	0,0038 \pm 0,0008	0,0250 \pm 0,0022	>0,2
MR12K	0,0721 \pm 0,0094	0,0072 \pm 0,0018	0,0708 \pm 0,0073	>0,15	0,0173 \pm 0,0027	0,0045 \pm 0,0012	0,0391 \pm 0,0065	>0,1
MS168	0,0038 \pm 0,0015	0,0014 \pm 0,0004	0,0076 \pm 0,0012	>0,5	0,0109 \pm 0,0029	0,0024 \pm 0,0004	0,0088 \pm 0,0013	>0,06
MS181	0,0505 \pm 0,0028	0,0042 \pm 0,0011	0,0782 \pm 0,0140	>0,2	0,0322 \pm 0,0069	0,0055 \pm 0,0012	0,0359 \pm 0,0058	>0,5
MS154	0,0008 \pm 0,0001	0,0007 \pm 0,0002	0,0021 \pm 0,0008	>0,05	0,0120 \pm 0,0020	0,0016 \pm 0,0006	0,0090 \pm 0,0018	>0,05
MS199	0,0021 \pm 0,0009	0,0016 \pm 0,0004	0,0099 \pm 0,0027	>0,025	0,0041 \pm 0,0009	0,0005 \pm 0,0002	0,0054 \pm 0,0007	>0,025
MS200	0,0378 \pm 0,0031	0,0049 \pm 0,0016	0,0295 \pm 0,0037	>0,05	0,0256 \pm 0,0067	0,0044 \pm 0,0015	0,0166 \pm 0,0023	>0,05
Dp44mT	0,0014 \pm 0,0001	0,0003 \pm 0,0001	0,0018 \pm 0,0004	>0,008	0,0004 \pm 0,0001	0,0001 \pm 0,00004	0,0009 \pm 0,0003	>0,001
DOX	0,0910 \pm 0,0070	0,0625 \pm 0,0082	0,0848 \pm 0,0112	>100	0,4050 \pm 0,0380	0,3356 \pm 0,0654	0,4136 \pm 0,0591	>0,6

Analiza wyników aktywności zamieszczonych w tabeli pozwala obserwować potencjalnie interesujący wpływ jonów żelaza na aktywność biologiczną badanych pochodnych. Mianowicie, w obecności jonów Fe^{2+} obserwowano znaczne zmniejszenie poziomu aktywności antyproliferacyjnej pochodnych TSC wobec badanych linii komórek nowotworowych. Efekt ten jest szczególnie wyraźny dla związków MS179, MS168, MS181, MS154, w przypadku których wykazano drastyczny spadek aktywności biologicznej wobec komórek linii HCT116 (Ryc. 14). Zjawisko to było szczególnie widoczne w przypadku pochodnej MS168, ponieważ przy stężeniu 132-krotnie wyższym niż IC_{50} , nadal nie obserwowano efektu cytotoksycznego wobec komórek raka jelita grubego. Z drugiej strony, w przypadku obecności w medium jonów Fe^{3+} , badane pochodne zachowują swoją aktywność biologiczną wobec obu badanych linii komórkowych - HCT116 oraz MCF-7. Interesującym jest fakt, że wyniki te stoją w sprzeczności z danymi literaturowymi dotyczącymi aktywności Triapiny i jej analogów. Jak wykazali Kowol i in., związki te odznaczały się znacznie mniejszą aktywnością w obecności jonów żelaza - Fe^{3+} wobec komórek raka jajnika i sutka [307]. Jednakże, należy zwrócić uwagę, na dwa ważne aspekty, które mogą wyjaśniać taki efekt. Po pierwsze badane pochodne oparte na fragmentach ketonu di-2-pirydylowego oraz chinoliny mogą odznaczać się nieco innym mechanizmem działania niż Triapina, która działa głównie poprzez inhibicję RR. Dodatkowo, istotny może być podstawowy poziom żelaza oraz ROS w komórkach nowotworowych. Jak już wspomniano, obie badane linie komórkowe - HCT116 oraz MCF-7 charakteryzują się zwiększonym poborem żelaza oraz wysoką ekspresją białek IRP, regulujących poziom tego pierwiastka w komórce [62,308,309]. Wyniki, ostatnich badań wskazują, że zmieniony metabolizm żelaza w komórkach raka piersi oraz jelita grubego może być związany ze zjawiskiem oporności. Zatem, stosowanie leków obniżających poziom żelaza komórkowego znacznie poprawia skuteczność leczenia [310,311]. Dlatego też, ogólny efekt cytotoksyczności badanych pochodnych TSC, może wynikać zarówno z ich silnych właściwości do chelatowania jonów żelaza, a także wrażliwości samych komórek na zmiany poziomu stężenia tego metalu, a także podstawowego poziomu ROS.

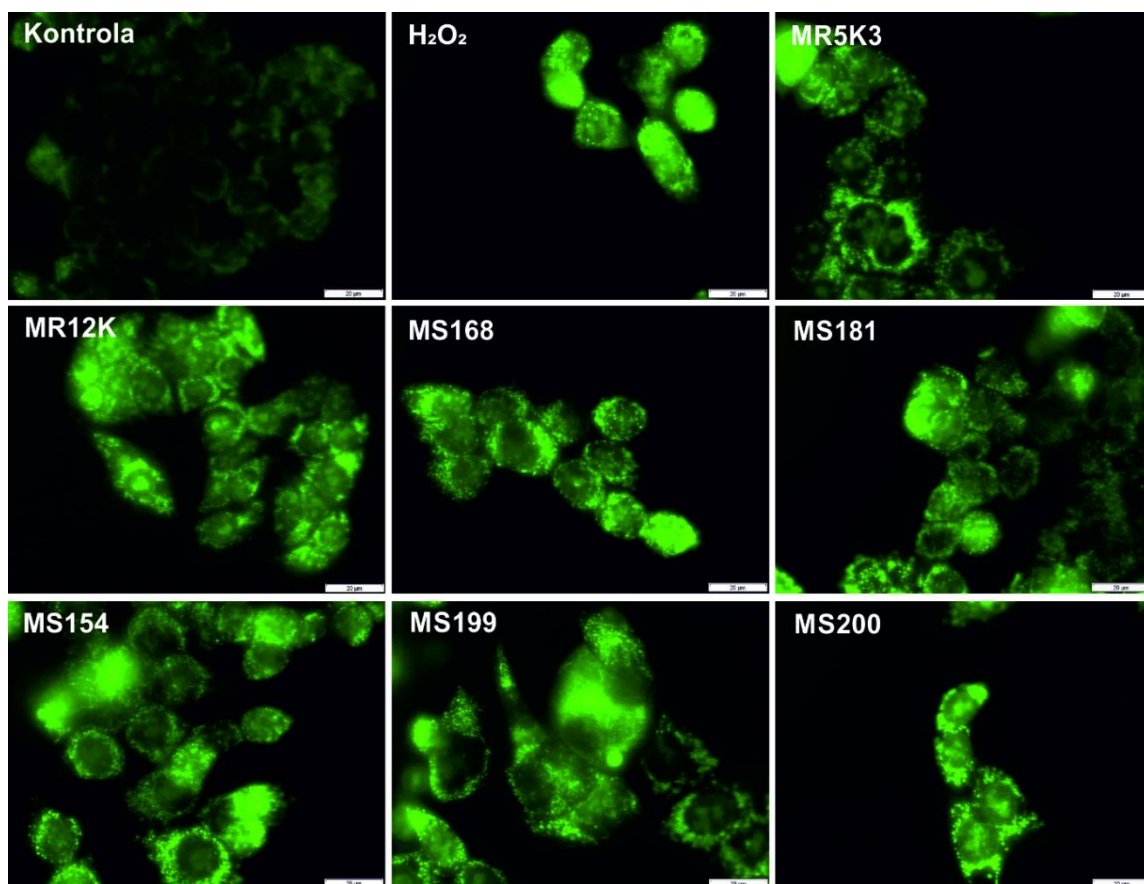


Ryc. 14 Porównanie aktywności biologicznej wybranych pochodnych TSC wobec komórek linii HCT116 w obecności jonów Fe^{2+} oraz Fe^{3+} .

Odmienny efekt obserwowano w przypadku wpływu jonów miedzi na aktywność biologiczną pochodnych TSC wobec komórek raka jelita grubego oraz piersi. Analiza cytotoksyczności wykazała zgodnie z założeniami, że dodatek do medium redoks aktywnego metalu, skutkował znacznym wzrostem poziomu aktywności antyproliferacyjnej badanych TSC. Najbardziej aktywnymi związkami w obecności jonów Cu^{2+} , okazały się pochodne MS154, MS199, Dp44mT zawierające w swej strukturze fragment ketonu di-2-pirydylowego, a także MS168 zbudowana na fragmencie 8-hydroksychinoliny. Z drugiej strony, najwyższy wzrost aktywności antyproliferacyjnej wobec komórek linii HCT116 obserwowano dla pochodnych opartych na fragmencie chinoliny oraz 8-HQ. Mianowicie, dla pochodnych MR12K oraz MS181 wykazano ponad 10-krotny wzrost aktywności biologicznej pod wpływem jonów Cu^{2+} . Z kolei, w przypadku komórek raka piersi, dla pochodnych MR5K3, MS154 oraz MS199 odnotowano 8-krotny wzrost skuteczności. Na podstawie powyższych obserwacji można więc wnioskować, że badane pochodne TSC wobec jonów miedzi mogą wykazywać odmienny niż w przypadku żelaza mechanizm oddziaływania z jonami miedzi, skupiony na działaniu jonoforycznym. Co istotne, podobnie obserwowany efekt może być ściśle związany ze zwiększonym poziomem podstawowym miedzi w komórkach obu linii nowotworowych, a także ich wrażliwością na zmiany stężenia tych jonów [139].

2.2 Wpływ TSC na generowanie reaktywnych form tlenu

W celu zbadania możliwości generowania ROS przez pochodne tiosemikarbazonu przeprowadzono test fluorescencyjny. W teście wykorzystano odczynnik CellROX Green, który pod wpływem reaktywnych form tlenu utlenia się do fotostabilnego produktu, emitującego jasno-zieloną fluorescencję. Ze względu na specyficzną akumulację tego barwnika w organelach komórkowych, sygnał fluorescencyjny jest zlokalizowany głównie w jądrze komórkowym oraz mitochondriach. Maksimum absorpcji barwnika wynosi 485 nm, podczas gdy emisja jest obserwowana przy długości fali 520 nm. Oznaczenia zostały przeprowadzone na komórkach linii HCT116, dla kilku najbardziej aktywnych pochodnych TSC po 24-godzinnej inkubacji. W celu weryfikacji poprawności testu fluorescencyjnego, a także porównania wyników zastosowano dwie kontrole. Kontrolę negatywną stanowiły komórki nietraktowane związkami, a kontrolę pozytywną - komórki inkubowane przez 15 minut ze 100 μ M roztworem H_2O_2 . Wyniki przedstawiono na Ryc. 15.

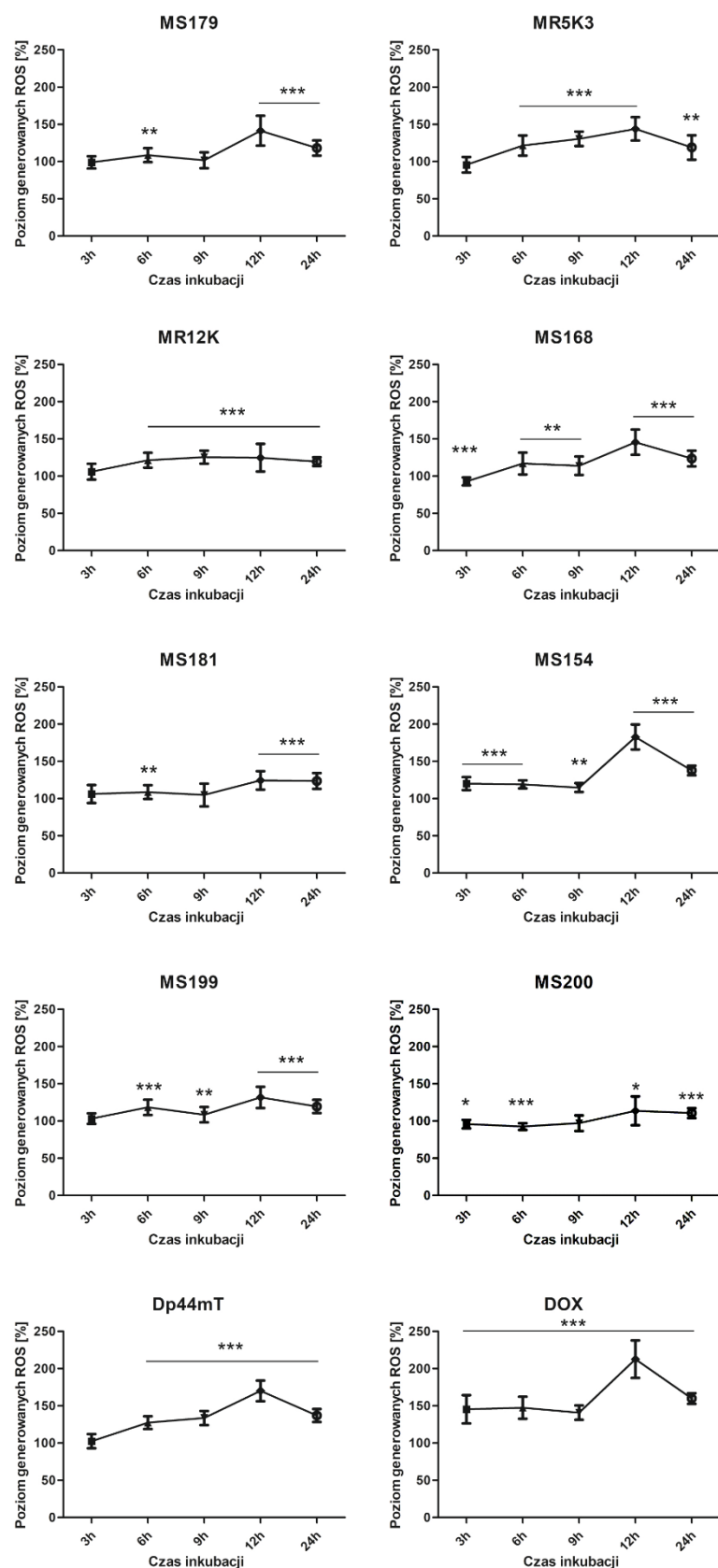


Ryc. 15 Generowanie reaktywnych form tlenu w komórkach linii HCT116 po 24-godzinnej inkubacji z badanymi pochodnymi TSC (stężenie; 2-razy IC_{50}) oraz 15- minutowej inkubacji z nadtlakiem

wodoru (100 μ M), który zastosowano jako kontrolę pozytywną. Negatywną kontrolę stanowiły komórki nietraktowane. Skala = 20 μ m.

Obserwacja mikroskopowa potwierdziła znaczne generowanie reaktywnych form tlenu po inkubacji z badanymi związkami, o czym świadczy intensywny zielony sygnał fluorescencyjny. Podobną sytuację odnotowano w przypadku komórek traktowanych roztworem nadtlenu wodoru. Z drugiej strony, komórki kontroli emitowały niski sygnał fluorescencyjny, który był związany z podstawowym poziomem ROS komórek raka jelita grubego wynikającym z procesów metabolicznych. Warto również zauważyć, że obserwowany sygnał fluorescencyjny w przypadku pochodnych TSC, skupiał się przede wszystkim wokół mitochondriów żywych komórek. Taki efekt może wynikać z akumulacji badanych związków w tych organellach. Te obserwacje zostały potwierdzone w późniejszych badaniach nad kolokalizacją pochodnych TSC i fotouczulaczy w komórkach raka jelita grubego (więcej w rozdziale 3.1). Podsumowując, otrzymane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia o generowaniu reaktywnych form tlenu przez pochodne TSC, które w znacznym stopniu są następstwem interakcji z jonami metali [305]. Co więcej, z uwagi na lokalizację badanych pochodnych w mitochondriach, można przypuszczać iż ich wpływ na system antyoksydacyjny komórek, powoduje upośledzenie funkcji tych organelli. Z kolei, takie działanie może przyczyniać się do uruchomienia procesów związanych z programowaną śmiercią komórek. W celu zweryfikowania tych hipotez przeprowadzono kolejne eksperymenty określające wpływ TSC na ilościowe zmiany poziomu ROS w komórkach nowotworowych, a także stężenia wewnątrzkomórkowego antyoksydanta - glutationu w zależności od czasu.

Zmiany poziomu reaktywnych form tlenu, generowanych w komórkach linii HCT116 poddanych działaniu badanych pochodnych TSC oraz DOX identyfikowano przy użyciu tego samego testu fluorescencyjnego. Analizy przeprowadzono dla różnych czasów inkubacji w eksperymencie kinetycznym. Znormalizowane wyniki względem komórek nietraktowanych, dla każdego badanego związku przedstawiono na Ryc. 16.



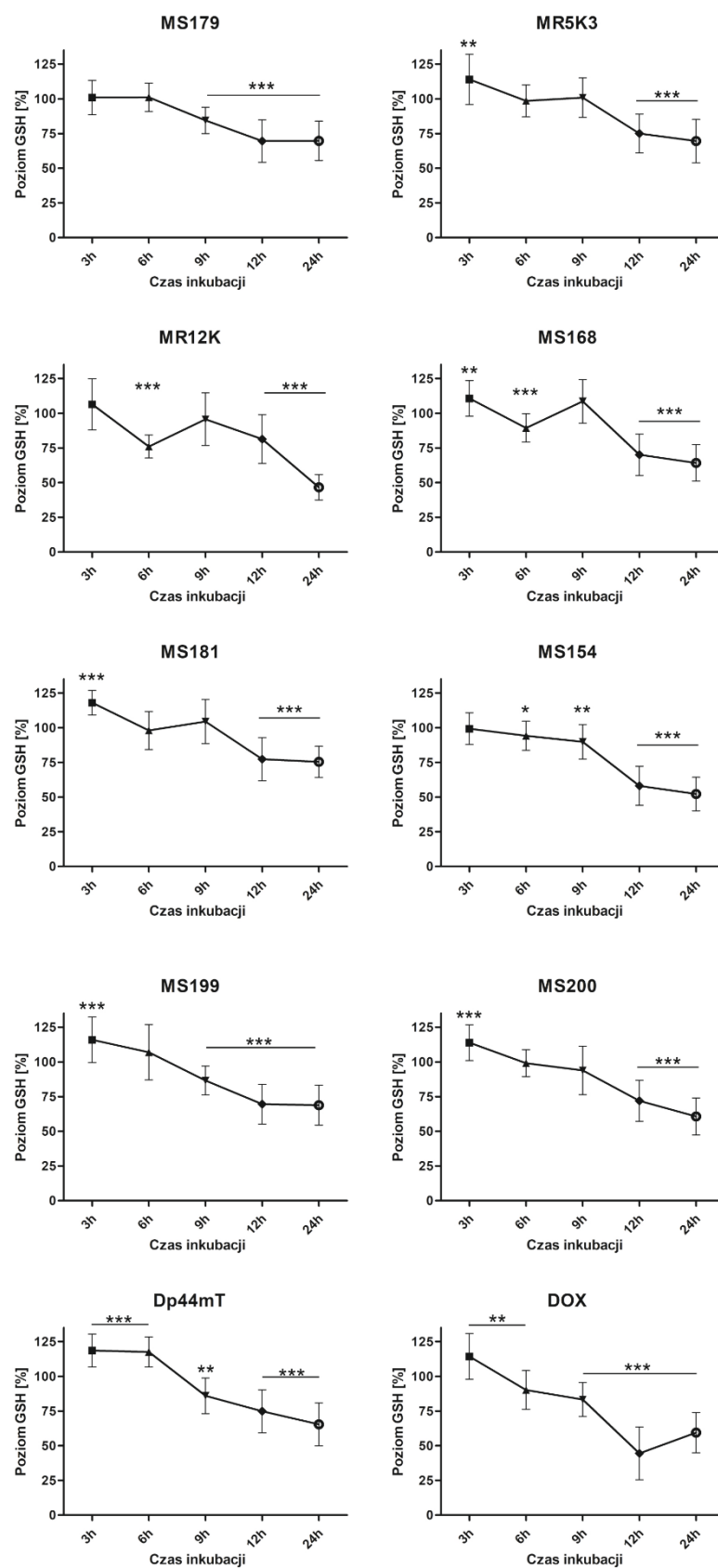
Ryc. 16 Wpływ badanych pochodnych TSC (1 μM) oraz DOX (5 μM) na poziom generowanych reaktywnych form tlenu w komórkach linii HCT116. Dane znormalizowano wobec komórek nietraktowanych (kontrola). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD z trzech niezależnych

eksperymentów. Dane analizowano przy pomocy testu-t Studenta: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli.

Analiza otrzymanych wyników wykazała stopniowy wzrost poziomu ROS w komórkach nowotworowych, który osiągnął maksimum po 12-godzinnej inkubacji ze wszystkimi badanymi pochodnymi. Dalsza obserwacja, ujawniła gwałtowny spadek poziomu ROS w komórkach po kolejnych 12 godzinach inkubacji. Wyjątek stanowią pochodne MR12K, MS181 oraz MS200 dla których obserwowano niewielki spadek ilości generowanych reaktywnych form tlenu. Warto zauważyć, że zwiększenie poziomu ROS w pierwszych 12 godzinach, było skorelowane z poziomem aktywności antyproliferacyjnej badanych pochodnych TSC wobec komórek linii HCT116 typu dzikiego. Dla najbardziej aktywnej pochodnej MS154 zanotowano najwyższy przyrost poziomu ROS (do 83% względem komórek nietraktowanych) wśród badanych TSC. Podobny efekt obserwowano dla analogu Dp44mT zawierającego w swej strukturze fragment ketonu di-2-pirydylowego. Mianowicie, po 12-godzinnej inkubacji z tym związkiem odnotowano 70% wzrost poziomu ROS względem komórek kontrolnych. Z kolei, dla najbardziej aktywnej pochodnej MS168 wśród analogów 8-hydroksychinoliny wykazano prawie 46% wzrost poziomu ROS po znormalizowaniu danych względem kontroli. Z drugiej strony, dla pozostałych analogów chinolinowych (MR12K, MS181), a także pochodnej MS200 zawierającej fragment di-2-pirydyłowy zanotowano nieznaczne zwiększenie poziomu ROS w komórkach nowotworowych.

2.3 Wpływ TSC na poziom wewnątrzkomórkowego glutationu w zależności od czasu

Zmiany poziomu stężenia glutationu w komórkach raka jelita grubego po traktowaniu badanymi pochodnymi TSC oraz DOX monitorowano przy pomocy metody opisanej przez Rahman i in. [312]. Metoda ta opiera się na reakcji GSH z kwasem 5,5-ditiobis(-2-nitrobenzoesowym) w obecności NADPH i reduktazy glutationu, w wyniku której powstaje barwny produkt kwas 2-nitro-5-tiobenzoesowy. Ilość i szybkość powstającego w reakcji produktu jest oznaczana spektrofotometrycznie oraz proporcjonalna do stężenia GSH w badanej próbce. Podobnie, jak w poprzednim eksperymencie kinetycznym, analizę przeprowadzono dla różnych czasów inkubacji. Znormalizowane wyniki względem komórek nietraktowanych, dla każdego badanego związku przedstawiono na Ryc. 17.



Ryc. 17 Wpływ badanych pochodnych TSC (1 μ M) oraz DOX (5 μ M) na poziom wewnątrzkomórkowego glutationu w komórkach linii HCT116. Dane znormalizowano wobec komórek nietraktowanych (kontrola). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD z trzech niezależnych

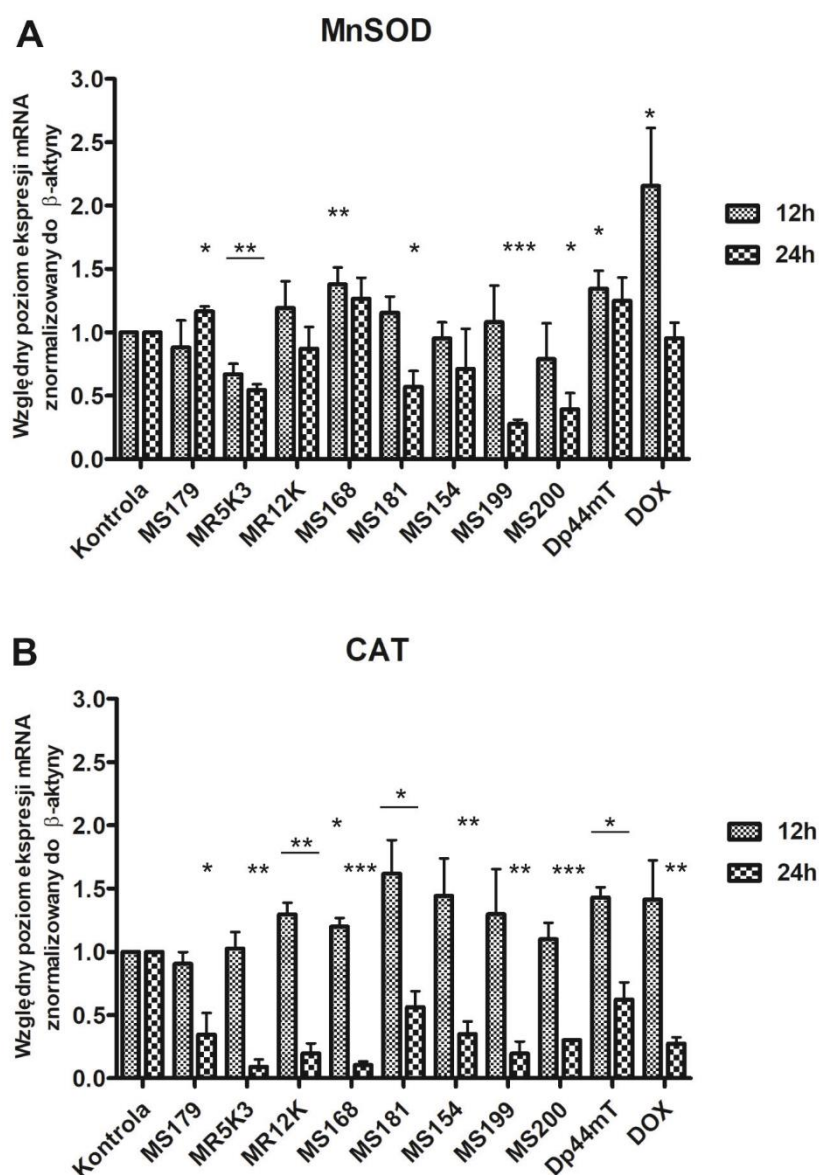
eksperymentów. Dane analizowano przy pomocy testu-t Studenta: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli.

Analiza uzyskanych wyników ujawniła odwrotną zależność zmian poziomu reaktywnych form tlenu oraz stężenia glutationu w komórkach poddanych działaniu badanych pochodnych TSC. Wzrost poziomu ROS w jednostce czasu wykazany w poprzednim eksperymencie wywołuje odpowiedni spadek zasobów antyoksydacyjnych w komórce, które osiągało wartość najniższą po 24 godzinach inkubacji z wszystkimi badanymi pochodnymi TSC. Największy efekt odnotowano dla pochodnej chinoliny MR12K, gdzie poziom GSH zmniejszył się o 53% w odniesieniu do komórek kontrolnych. Podobny efekt obserwowano dla najbardziej aktywnej pochodnej MS154 zawierającej w swej strukturze fragment ketonu di-2-pirydylowego. Mianowicie, po 24-godzinnej inkubacji z tym związkiem odnotowano 48% spadek wewnątrzkomórkowego poziomu GSH względem kontroli. Z drugiej strony, po inkubacji z pochodnymi chinoliny - MS179, MR5K3, MS181 zanotowano najmniejszą zmianę stężenia tego antyoksydanta - 25-30% w odniesieniu do komórek nietraktowanych.

Podsumowując, otrzymane rezultaty potwierdzają wcześniej postawione hipotezy. Udział wysoce aktywnych pochodnych TSC w reakcjach Fentona i Haber-Weissa, ma kluczowe znaczenie dla ich poziomu aktywności biologicznej. Odgrywa także główną rolę w ich wieloaspektowym mechanizmie działania. Wysoki poziom generowanych ROS przez pochodne TSC, prowadzi w znaczącym stopniu do utlenienia wewnątrzkomórkowego poziomu GSH. Takie skoncentrowane działanie skierowane na jeden z elementów systemu obrony antyoksydacyjnej skutkuje załamaniem całego potencjału antyoksydacyjnego komórki. To z kolei, prowadzi do zwiększonej wrażliwości komórek na działanie ROS i nasilenia stresu oksydacyjnego [231–233]. Ponadto, spadek stężenia glutationu w komórce jest wczesnym sygnałem wskazującym na indukcję apoptozy w odpowiedzi na różne bodźce [234]. Co więcej, taki efekt jest obserwowany niezależnie od udziału białka p53 w wyzwoleniu programowanej śmierci komórek [313,314].

2.4 Wpływ TSC na ekspresję genów związanych ze stresem oksydacyjnym

Wpływ badanych pochodnych TSC na ekspresję genów odpowiedzialnych za utrzymanie równowagi oksydacyjnej w komórkach oznaczono metodą PCR w czasie rzeczywistym w trzech niezależnych eksperymentach, a wyniki przedstawiono w formie wykresów na Ryc. 18.

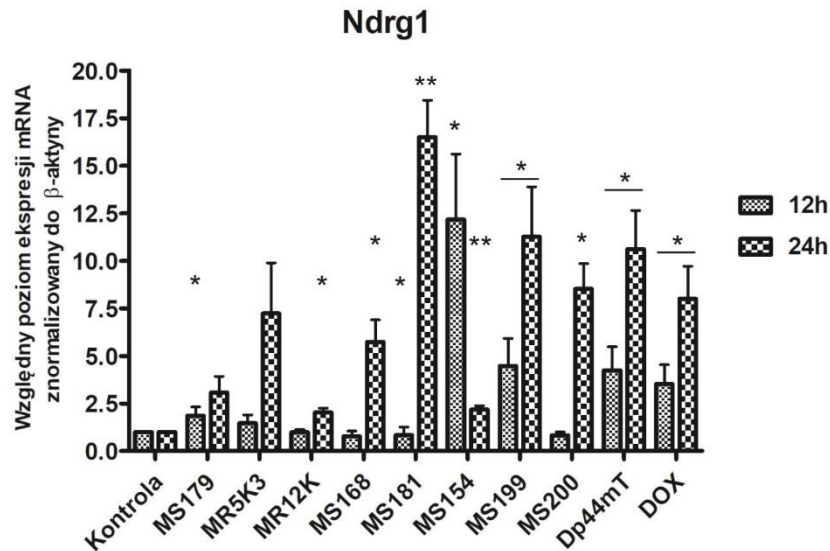


Ryc. 18 Wpływ badanych pochodnych TSC (1 μ M) oraz DOX (5 μ M) na ekspresję genów MnSOD, CAT w komórkach linii HCT116. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów. Dane analizowano przy pomocy testu-t Studenta: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli (komórki nietraktowane).

Analizę zmian ekspresji genów po traktowaniu badanymi pochodnymi przeprowadzono dla dwóch różnych czasów inkubacji. W przypadku 12-godzinnej traktowania komórek pochodnymi TSC - MR12K, MS168, MS181, MS199 obserwowano nieznacznie podwyższonego poziomu ekspresji genu dysmutazy nadtlenkowej (MnSOD) w porównaniu z komórkami kontrolnymi. W przeciwieństwie, do związku referencyjnego - DOX, gdzie obserwowano ponad 2-krotne zwiększenie poziomu MnSOD. Z drugiej strony, w przypadku inkubacji z pochodną MR5K3 odnotowano znaczny spadek ekspresji tego genu w komórkach. Dalsza analiza otrzymanych wyników ujawniła spadek ekspresji genu MnSOD w komórkach po 24-godzinnej inkubacji z większością badanych związków. Najwyższy efekt uzyskano dla pochodnej MS199 opartej na fragmencie ketonu di-2-pirydylowego. W czasie postępującego czasu inkubacji z badanym związkiem obserwowano prawie 4-krotne zmniejszenie ekspresji transkryptu. Jedyny wyjątek stanowiła pochodna MS179, dla której po 24-godzinnej inkubacji obserwowano niewielki wzrost poziomu MnSOD.

W przypadku, genu katalazy obserwowano podobne zależności. Analiza wyników wykazała wzrost poziomu ekspresji CAT w komórkach poddanych 12-godzinnej traktowaniu z badanymi pochodnymi TSC. Największy efekt obserwowano dla pochodnych MR12K, MS181, MS154, MS199. Po inkubacji z najbardziej aktywną pochodną MS154 stwierdzono prawie 1,5-krotny wzrost ekspresji tego genu w odniesieniu do komórek kontrolnych. Ponadto, dalsza analiza ujawniła gwałtowny spadek poziomu CAT w komórkach po 24-godzinnej inkubacji z wszystkimi badanymi TSC. Warto zauważyć, że ogólny efekt wydawał się ściśle skorelowany z poziomem aktywności antyproliferacyjnej badanych TSC wobec komórek linii HCT116 typu dzikiego. Zatem, w czasie postępującego czasu inkubacji z pochodnymi chinolinowymi MS168 oraz MR5K3, obserwowano ponad 11-krotne zmniejszenie poziomu ekspresji CAT w komórkach. Z kolei, po traktowaniu komórek najbardziej aktywną pochodną MS154 stwierdzono ponad 4-krotne spadki ekspresji poziomu katalazy. Podobnie, po 24-godzinnej inkubacji z drugą wysoce aktywną pochodną MS199 obserwowano ponad 6,5-krotne obniżenie poziomu CAT w komórkach.

Jednym z istotnych czynników zaangażowanych w indukcję odpowiedzi na wywołany stres oksydacyjny, oraz wyzwolenie apoptozy jest Ndr1. Wyniki dla tego genu przedstawiono w formie wykresu na Ryc. 19.



Ryc. 19 Wpływ badanych pochodnych TSC (1 μ M) oraz DOX (5 μ M) na ekspresję genu Ndrgr1 w komórkach linii HCT116. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów. Dane analizowano przy pomocy testu-t Studenta: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli (komórki nietraktowane).

Analiza otrzymanych wyników wykazała znaczny wzrost poziomu ekspresji genu Ndrgr1 w komórkach poddanych 12-godzinnej traktowaniu z najbardziej aktywnymi pochodnymi TSC (MS154, MS199, MS200). Mianowicie, w przypadku pochodnych MS199 oraz Dp44mT opartych na ketonie di-2-pirydylowym obserwowano ponad 4-krotny wzrost ekspresji tego genu w porównaniu z komórkami nietraktowanymi. Z kolei, po 12-godzinnej inkubacji z najbardziej aktywnym związkiem - MS154 wykazano ponad 11-krotne zwiększenie poziomu ekspresji Ndrgr1 w komórkach. Ponadto dalsza analiza ujawniła znaczący wzrost poziomu Ndrgr1 w komórkach po 24-godzinnej inkubacji ze wszystkimi badanymi TSC. Najwyższy efekt obserwowano po traktowaniu komórek pochodnymi MS181, MS199 oraz Dp44mT. Po inkubacji z pochodnymi opartymi na fragmencie ketonu di-2-pirydylowego odnotowano ponad 10-krotne zwiększenie poziomu ekspresji badanego genu w odniesieniu do komórek kontrolnych. Z kolei, po traktowaniu komórek analogiem chinoliny (MS181) stwierdzono ponad 16-krotny wzrost poziomu ekspresji Ndrgr1 w komórkach.

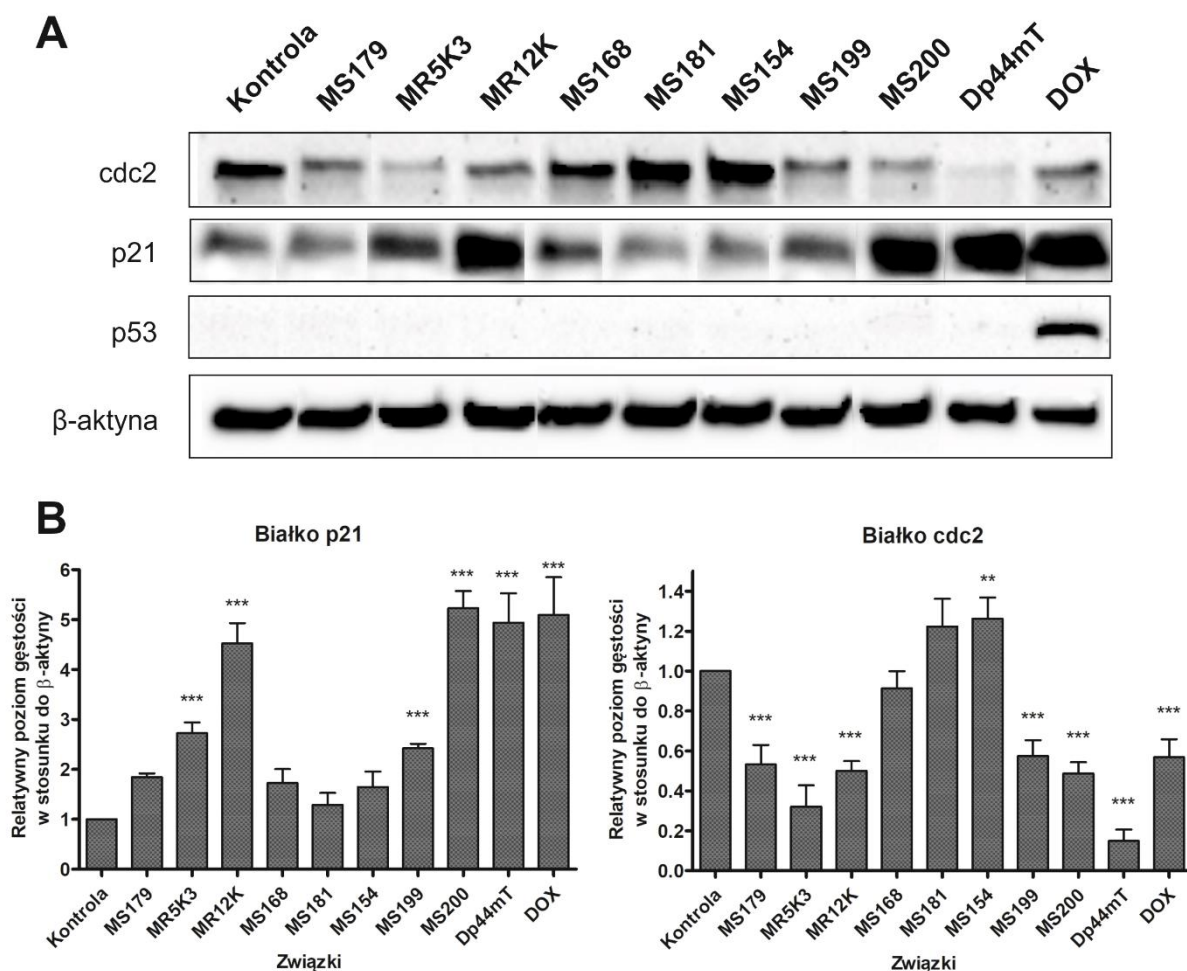
Obniżenie ekspresji genów oraz białek odpowiadających za obronę antyoksydacyjną w połączeniu ze zwiększonym poziomem ROS, jest istotnym czynnikiem wywołującym stres oksydacyjny w komórce [315]. Badania nad wpływem pochodnych TSC na regulację genów

dysmutazy nadadtlenkowej oraz katalazy, wykazały po początkowym wzroście, znaczne obniżenie poziomu ich ekspresji w komórkach raka jelita grubego. Takie działanie, wydaje się odgrywać kluczową rolę w załamaniu komórkowego potencjału antyoksydacyjnego komórek w wyniku zwiększonej produkcji ROS, co skutkuje uruchomieniem szlaków odpowiedzialnych za wywołanie apoptozy. Interesujący jest również fakt, że katalaza może wpływać na mechanizm wielolekowej oporności - MDR, tym samym chroniąc komórki przed wejściem na drogę apoptozy [219,230]. Dlatego też, istotne wydaje się obniżenie poziomu ekspresji tego genu w komórkach, co jest szczególnie widoczne w przypadku najbardziej aktywnych TSC. Jak już wspomniano, zwiększenie ekspresji genu Ndr1 w wyniku stosowania leków jest ważnym czynnikiem odpowiedzi na stres w wielu typach nowotworów [316,317]. Warto bowiem zauważyć, że komórki nowotworowe charakteryzują się zwykle bardzo niskim poziomem ekspresji tego genu. Taką sytuację obserwuje się szczególnie w przypadku komórek raka sutka, okrężnicy oraz prostaty [318]. Ostatnie badania dowodzą również, że ekspresja genu Ndr1 jest często powiązana z poziomem białka p53 oraz HIF-1 α [82,319]. Ponadto, liczne doniesienia wskazują, że wzrost ekspresji tego genu w wyniku stosowania chemioterapeutyków, może prowadzić do zahamowania wzrostu komórek oraz indukcji apoptozy. Uzyskane rezultaty w przypadku badanych pochodnych TSC wydają się potwierdzać wcześniejsze doniesienia. Obserwowana wysoka ekspresja Ndr1 w komórkach poddanych działaniu TSC, jednoznacznie wskazuje, że komórki zostały wprowadzone na apoptotyczny szlak śmierci komórkowej [317]. Ponadto, ostatnie badania wykazały, że zmiany wewnątrzkomórkowej puli żelaza w wyniku chelatacji istotnie wpływają na zwiększenie ekspresji Ndr1 na poziomie transkryptu, jak i białka [82,97].

2.5 Wpływ TSC na ekspresję białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego oraz indukcję apoptozy

Jak wykazano w poprzednich eksperymentach, pochodne TSC poprzez generowanie ROS, przyczyniają się do załamania homeostazy potencjału redoks w komórkach raka jelita grubego. Zjawisko to aktywuje wiele ścieżek sygnalizacyjnych, które w efekcie końcowym wyzwalają apoptozę. Warto zauważyć, iż istotny wpływ na te procesy, a także postęp cyklu komórkowego mają również zmiany wewnątrzkomórkowej puli żelaza. Z tego względu, dalsza charakterystyka mechanizmu działania badanych pochodnych TSC była skoncentrowana na ocenie ekspresji białek odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego oraz indukcję śmierci komórkowej. Wpływ badanych pochodnych na ekspresję białek p21, p53 oraz cdc2

określono przy pomocy metody western blot, a wyniki przedstawiono na Ryc. 20. Ponadto, dla białek cdc2 oraz p21 dokonano analizy densytometrycznej na podstawie gęstości optycznej uzyskanych prążków. Otrzymane dane liczbowe znormalizowano do wyników uzyskanych dla kontroli (Ryc. 20B).



Ryc. 20 Wpływ badanych pochodnych TSC (1 μ M) oraz DOX (5 μ M) na ekspresję białek: cdc2, p21, p53 i β -aktyny w komórkach linii HCT116 (A). Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowanej względem β -aktyny, które stanowią średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów. Ocenę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli (B).

Analiza western blot ujawniła, że żadna z badanych pochodnych TSC nie wpływała na aktywację białka p53 w komórkach linii HCT116. Odminną sytuację obserwowano w przypadku związku referencyjnego - doksorubicyny, dla której wykazano pozytywny efekt.

Z drugiej strony, po inkubacji z wszystkimi badanymi związkami obserwowano wzrost ekspresji białka p21^{WAF1/CIP1}. Najwyższy efekt odnotowano dla analogu chinoliny MR12K oraz pochodnych MS200 i Dp44mT opartych na ketonie di-2-pirydylowym. Przeprowadzona analiza densytometryczna wykazała ponad 4,5-krotne zwiększenie poziomu ekspresji białka p21 po inkubacji z badanymi pochodnymi. Również, po inkubacji z ich analogami MR5K3 oraz MS199 stwierdzono istotnie znaczący, ponad 2,5-krotny wzrost poziomu ekspresji p21 w odniesieniu do komórek kontrolnych. Warto zauważyć, że obserwowany efekt wydawał się korelować ze wzrostem poziomu ekspresji genu Ndr1. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze doniesienia o zwiększeniu ekspresji białka p21^{WAF1/CIP1} za pośrednictwem genu Ndr1 [94]. Takie działanie, prowadzi do aktywacji tego białka na drodze niezależnej od białka p53, co wpływa na aktywację kaspaz i indukcję apoptozy w komórkach [94,320]. Co więcej, badania przeprowadzone przez Russo i in., wskazują, że stres oksydacyjny indukuje ekspresję WAF1/CIP1, co w konsekwencji zatrzymuje progresję cyklu komórkowego poprzez mechanizm niezależny od p53 [321].

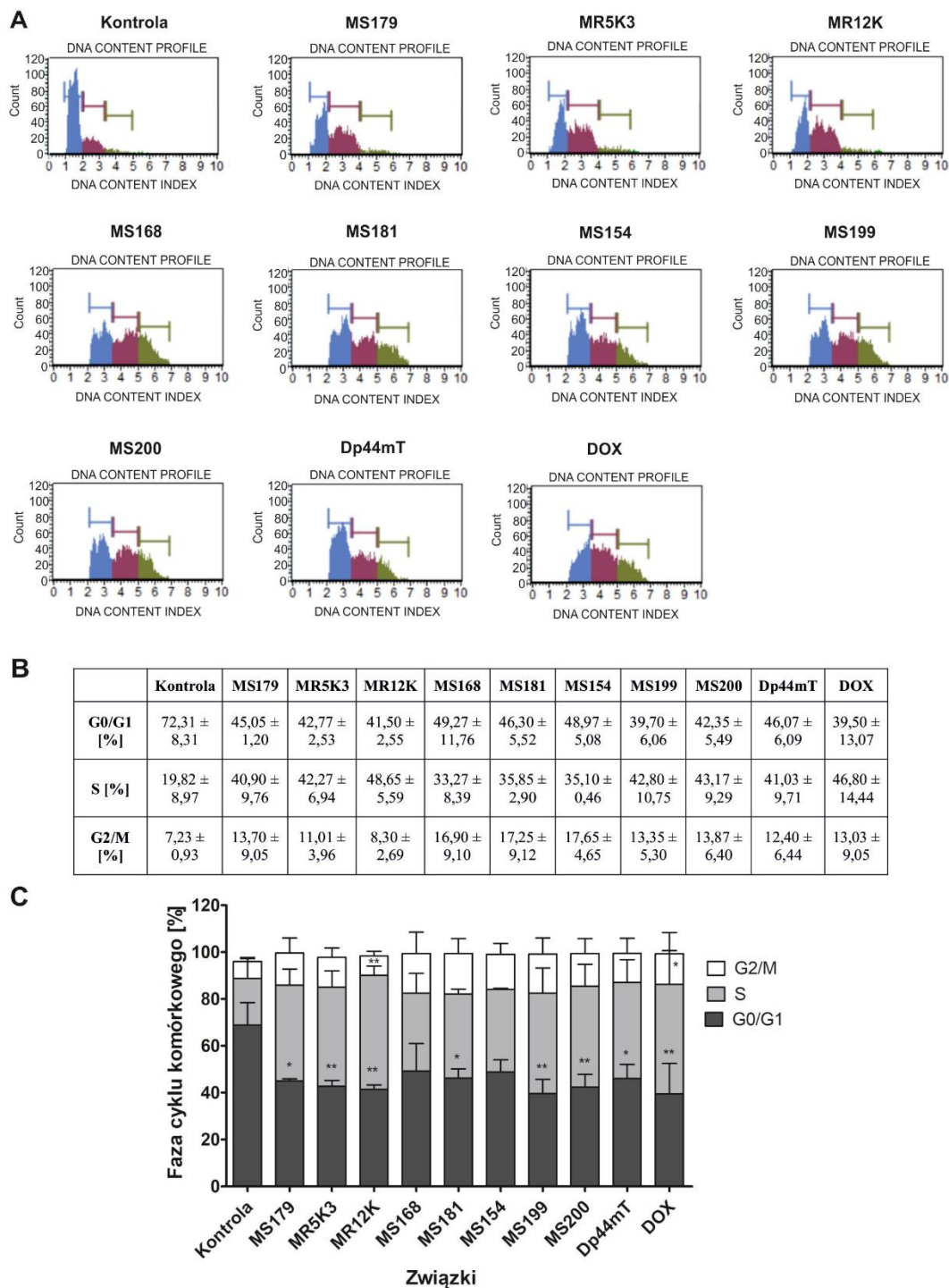
Ponadto, analiza otrzymanych wyników ujawniła wzrost ekspresji białka cdc2 po inkubacji z pochodnymi MS154 oraz MS181. Z drugiej strony, w przypadku pozostałych związków obserwowano zmniejszenie poziomu ekspresji badanego białka w komórkach. Najwyższy spadek poziomu ekspresji białka cdc2, obserwowano po inkubacji z pochodnymi MR5K3, MS199 oraz Dp44mT. Taki efekt, korelował ze zdolnością tych związków do wywołania znacznego obniżenia ekspresji genu MnSOD po 24-godzinnej inkubacji (Ryc. 18). Jak wykazały ostatnie badania, fosforylacja dysmutazy nadadtlenkowej MnSOD przez białko cdc2 może być regulowana w wyniku odpowiedzi na powstały stres oksydacyjny lub uszkodzenia wywołane promieniowaniem elektromagnetycznym [322,323].

2.6 Wpływ TSC na regulację cyklu komórkowego

Poziom stężenia reaktywnych form tlenu w komórce może być ściśle regulowany w czasie cyklu komórkowego. Jak wskazano w wielu doniesieniach, stężenie wolnych rodników stopniowo wzrasta w czasie kolejnych przejść faz cyklu komórkowego, począwszy od fazy G1 przez fazę syntezy do fazy G2/M. Następnie po podziale komórkowym, stężenie wolnych rodników powraca do poziomu pierwotnego. Zatem, widoczne zmiany poziomu ROS w czasie trwania cyklu komórkowego są ściśle skorelowane z przyrostem zawartości DNA. Warto również zauważyć, że białka antyoksydacyjne oraz pro-oksydacyjne są regulowane

w zależności od ogólnej szybkości metabolizmu komórek [227,228]. Ostatnie badania wskazują na okresowe zmiany poziomu aktywności MnSOD w czasie postępu cyklu komórkowego. W fazach G1 oraz S obserwowana jest wysoka aktywność tego białka, w przeciwieństwie do faz G2/M [226]. Ponadto, liczne doniesienia literaturowe wskazują, że utrata kontroli potencjału redoks podczas przejść między fazami spoczynku (G0) i aktywnymi (G1, S, G2 i M) może poważnie wpłynąć na zdolność komórek do proliferacji [228].

Wpływ badanych pochodnych TSC na zatrzymanie cyklu komórkowego monitorowano przy pomocy barwienia jodkiem propidyny w mikrokapilarnym cytometrze przepływowym Muse Cell Analyzer. W oznaczeniu tym, wykorzystuje się zdolność jodku propidyny do wiązania z dwuniciowym DNA i formowania z nim silnie fluorescencyjnego adduktu. Takie działanie pozwala na rozróżnienie komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, na podstawie oceny zawartości DNA. Rozkład cyklu komórkowego analizowano po 48-godzinnej inkubacji z badanymi pochodnymi. Histogramy DNA uzyskane w czasie analizy cytometrycznej, dla jednego z eksperymentów przedstawiono na Ryc. 21.



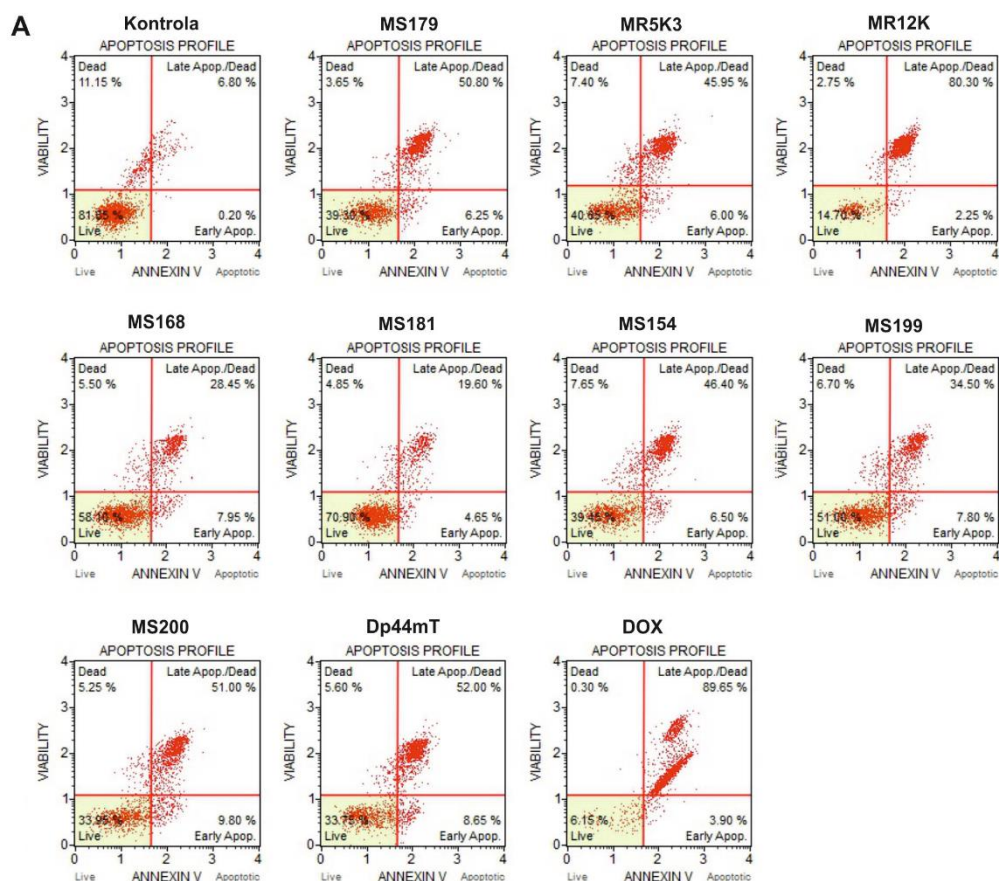
Ryc. 21 Wpływ badanych pochodnych TSC (1 μ M) oraz DOX (5 μ M) na regulację cyklu komórkowego linii HCT116. Zaprezentowane histogramy obrazują frakcję komórek znajdujących się w fazach G0/G1, S, G2/M cyklu komórkowego dla jednego z eksperymentów (A). W tabeli przedstawiono wyniki jako średnią \pm SD odsetka komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego z trzech niezależnych eksperymentów (B). Ocenę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli (C).

Analiza cytometryczna, ujawniła znaczny spadek populacji komórek znajdujących się w fazie G0/G1 po inkubacji z wszystkimi badanymi związkami. Po inkubacji z jedną z najbardziej aktywnych pochodnych - MS199, stwierdzono znaczne zmniejszenie odsetka komórek w fazie G0/G1 (do poziomu 39%). W przypadku komórek nietraktowanych populacja znajdująca się w tej fazie stanowiła 72% (Ryc. 21B). Ponadto dalsza analiza ujawniła, że wszystkie pochodne TSC powodowały znaczny wzrost frakcji komórek znajdujących się w fazie S cyklu komórkowego. Mianowicie, po inkubacji z pochodnymi opartymi na fragmencie chinoliny (MS179, MR5K3, MR12K) oraz ketonu di-2-pirydylowego (MS199, MS200, Dp44mT) obserwowano 40-48% wzrost liczby komórek w tej fazie cyklu komórkowego. Mniejszy efekt odnotowano dla pochodnych MS168, MS181 oraz MS154, gdzie obserwowano wzrost populacji komórek o 33-35%. Wyniki te sugerują, że pochodne TSC wpływają na zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S.

W przypadku fazy G2/M cyklu komórkowego, tylko po inkubacji z pochodnymi zawierającymi fragment 8-HQ oraz związkiem MS154 odnotowano wzrost odsetka komórek do poziomu 17%. Populacja komórek nietraktowanych znajdujących się w tej fazie stanowiła 7% (Ryc. 21B). Warto zauważyć, że wyniki dla MS181 oraz MS154 korelowały z ich zdolnością do zwiększenia poziomu ekspresji białka cdc2 w komórkach HCT116. Istotnym jest fakt, że białko cdc2 bierze udział w przejściu pomiędzy fazami G2 i M, wprowadzając komórki w fazę mitozy. Ponadto, jego aktywność jest podtrzymywana w czasie trwania profazy i metafazy podczas procesu podziału komórkowego. W związku tym, uzyskane rezultaty dla pochodnych MS181 oraz MS154 wydają się potwierdzać zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M. Ponadto, jak sugerują liczne doniesienia, komórki zatrzymane w tej fazie mogą ulegać katastrofie mitotycznej [85,324]. Z drugiej strony, Topham i in. postulowali, że przedłużone zatrzymanie komórek w fazie mitotycznej, może prowadzić do ich śmierci poprzez apoptozę w tej fazie cyklu. Co więcej, postulowano, wyjście komórek z mitozy bez podziału w wyniku poślizgu mitotycznego (ang. *mitotic slippage*) [325]. W efekcie komórki wkraczały w fazę pseudo-G1 bez cytokinezy, gdzie ulegały zatrzymaniu w punkcie kontrolnym G1/S [326]. Takie działanie, prowadziło w ostateczności do skierowania komórek na drogę apoptozy, związaną z mitochondrialnym szlakiem sygnałowym [325].

2.7 Ocena wpływu TSC na indukcję apoptozy

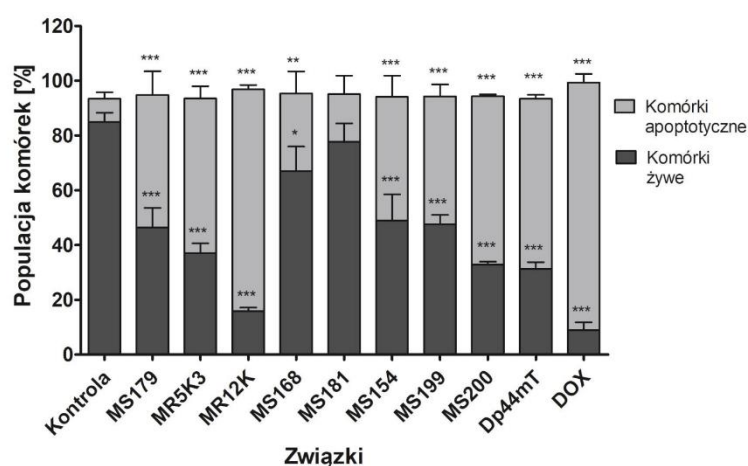
W celu określenia wpływu badanych pochodnych na indukcję procesu apoptozy w komórkach linii HCT116 wykonano barwienie Aneksyną V w mikrokapilarnym cytometrze przepływowym Muse Cell Analyzer. Jednym z pierwszych symptomów wczesnego stadium programowanej śmierci komórki jest utrata asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów w błonie komórkowej. Związane jest to z translokacją fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony cytoplazmatycznej. Wykrycie tych zmian jest możliwe, dzięki zdolności Aneksyny V sprzężonej z FITC do specyficznego wiązania cząsteczek fosfatydyloseryny. Ponadto, do barwienia późnych komórek apoptotycznych oraz oceny integralności błony komórkowej wykorzystano barwnik 7-aminoaktynomycynę (7-AAD). Na podstawie zastosowanego podwójnego barwienia w cytometrze przepływowym możliwe jest rozróżnienie czterech populacji komórek: żywych (niebarwiących się żadnym odczynnikiem), wczesnoapoptotycznych (barwiących się tylko Aneksyną V), późnoapoptotycznych (barwiących się Aneksyną V oraz 7-AAD), oraz komórek martwych (barwiących się tylko 7-AAD) [327]. Uzyskane wyniki przedstawiono na Ryc. 22.



B

	Kontrola	MS179	MR5K3	MR12K	MS168	MS181	MS154	MS199	MS200	Dp44mT	DOX
Żywe [%]	84,99 ± 3,32	46,45 ± 10,11	37,05 ± 5,10	15,93 ± 1,73	67,05 ± 12,65	77,65 ± 9,55	48,99 ± 13,48	47,60 ± 4,81	32,87 ± 1,53	31,35 ± 3,40	8,98 ± 4,00
Apoptotyczne [%]	8,46 ± 2,32	48,38 ± 12,27	56,47 ± 6,39	80,93 ± 2,30	28,34 ± 11,41	17,50 ± 9,55	45,09 ± 11,05	46,67 ± 6,18	61,47 ± 0,95	62,08 ± 2,02	90,41 ± 4,44

C



Ryc. 22 Wpływ badanych pochodnych TSC (1 μ M) oraz DOX (5 μ M) na indukcję apoptozy w komórkach linii HCT116 po 48-godzinnej inkubacji. Zaprezentowane histogramy obrazują frakcję komórek żywych, wczesno- oraz późno- apoptotycznych dla jednego z eksperymentów (A). W tabeli przedstawiono wyniki jako średnią \pm SD procentu komórek żywych, wczesno- oraz późno-

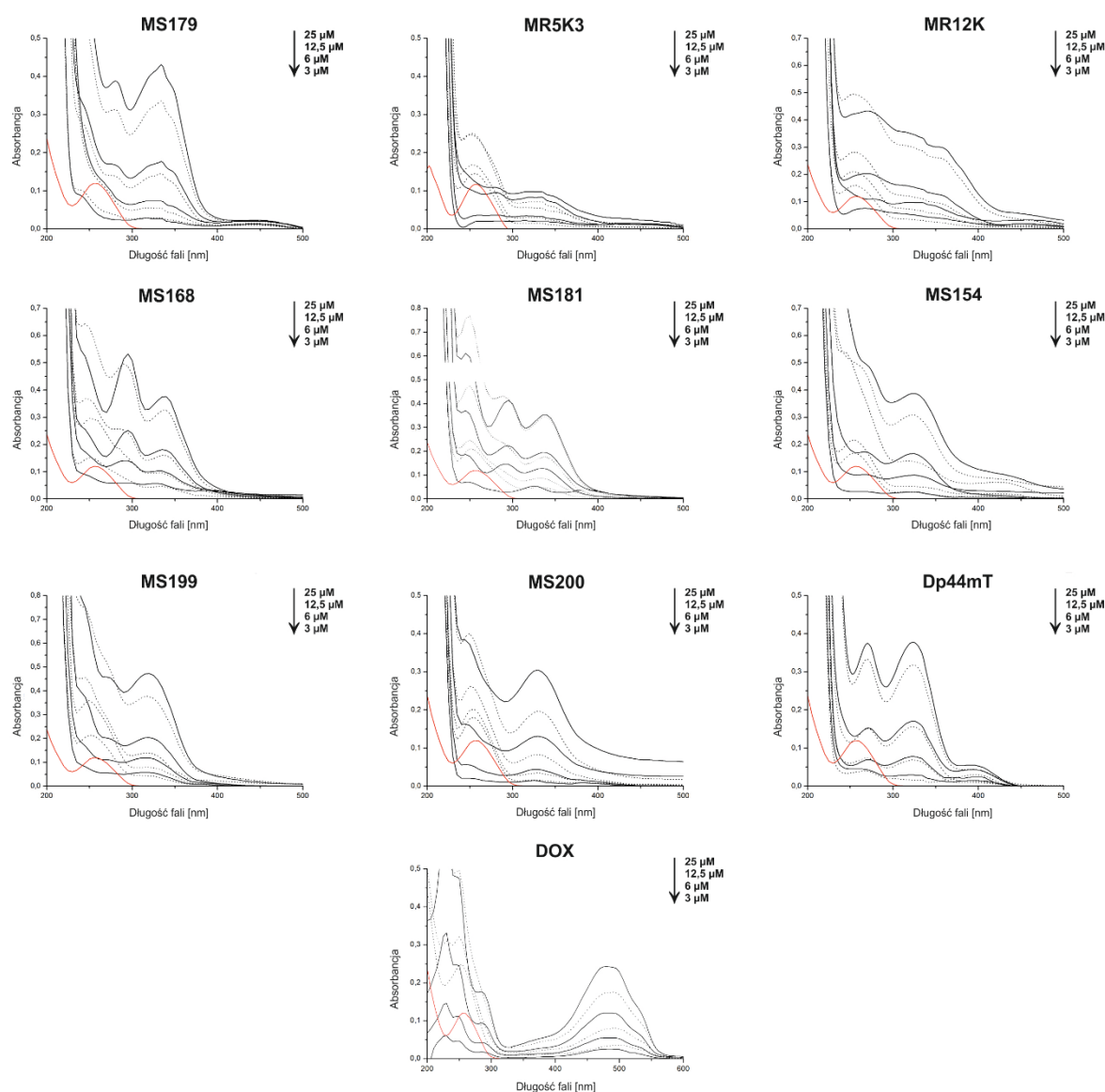
apoptotycznych z trzech niezależnych eksperymentów (B). Ocenę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli (C).

Analiza otrzymanych wyników potwierdziła zdolność badanych związków do indukcji apoptozy w komórkach HCT116. Po 48-godzinnej inkubacji z badanymi pochodnymi obserwowano znaczący przyrost frakcji komórek apoptotycznych. Najwyższy efekt odnotowano dla pochodnych MR12K, MS200, Dp44mT oraz DOX, gdzie frakcja tych komórek stanowiła od 60% do 80% (Ryc. 22B). Warto zauważyć, że wyniki te korelowały ze zdolnością tych pochodnych do znacznego zwiększenia poziomu ekspresji białka p21 w komórkach HCT116. Tym samym, potwierdza to wcześniejsze hipotezy, o indukcji śmierci komórkowej poprzez aktywację białka p21. Z drugiej strony, w przypadku pochodnych 8-hydroksychinoliny MS168 oraz MS181 stwierdzono najniższy odsetek komórek apoptotycznych, który może wiązać się z późniejszym wstąpieniem komórek na drogę apoptozy lub ich skierowaniem na drogę katastrofy mitotycznej. Innym możliwym wyjaśnieniem jest silna zdolność do chelatowania jonów żelaza przez TSC, co w połączeniu z zaburzeniem potencjału oksydacyjno-redukcyjnego komórki może prowadzić do silnego efektu zatrzymania progresji cyklu komórkowego, a tym samym niższej liczby komórek apoptotycznych.

2.8 Interkalacja DNA

Innym możliwym mechanizmem działania, który charakteryzuje większość planarnych związków aromatycznych, jest interkalacja DNA. Wiele doniesień literaturowych postuluje, że takie działanie może być związane z kompleksowaniem jonów metali przejściowych, takich jak żelazo, miedź, nikiel przez pochodne chinoliny, 8-hydroksychinoliny, czy też tiosemikarbazonu [277,328–330]. Ponadto, ostatnie badania nad grupą pochodnych chinoliny wskazały, że ich aktywność antyproliferacyjna oraz niezależny mechanizm działania od białka p53, może być związany ze zdolnością do interkalowania DNA [279,331]. Obecnie, wiele związków należących do klasy chelatorów żelaza jest klasyfikowanych jako inhibitory lub trucizny topoisomerazy [332]. Dlatego też sugeruje się, że zdolność ligandów oraz ich kompleksów z metalami do wiązania się z DNA, może indukować zmiany konformacyjne, które mogą prowadzić do powstawania naprężeń i uszkodzeń nici kwasów nukleinowych [333].

W celu określenia zdolności badanych pochodnych TSC do interkalacji DNA przeprowadzono pomiary spektrofotometryczne, w obecności standardowego DNA pochodzącego z grasicy cielęcej (ang. *calf-thymus* DNA; CT-DNA), a także samych pochodnych w buforze PBS. Widma absorpcyjne badanych związków przedstawiono na Ryc. 23. Dodatkowo, właściwości spektralne widm absorpcji dla badanych pochodnych związanych z CT-DNA podano w tabeli 17. W trakcie badań jako związek referencyjny wykorzystano dokсорubicynę, która jest dobrze scharakteryzowanym lekiem interkalującym [334].



Ryc. 23 Widma absorpcyjne badanych pochodnych TSC oraz DOX bez CT-DNA (linia ciągła) oraz w obecności CT-DNA (linia przerywana) w buforze PBS. Czerwona linia wskazuje CT-DNA w PBS.

Analiza zarejestrowanych widm absorpcji dla pochodnych TSC ujawniła ich zdolność do interkalacji z DNA, co wiązało się ze spadkiem intensywności absorbancji oraz przesunięciem maksimum w kierunku fal dłuższych (przesunięcie ku czerwieni). Obserwowane zmiany intensywności widm (efekt hipochromowy) są spowodowane deformacją helisy oraz zmianami konformacyjnymi DNA, które mogą prowadzić do pęknięć nici [335]. Największe zmiany widm absorpcji obserwowano dla grupy najaktywniejszych pochodnych TSC opartych na ketonie di-2-pirydyłowym. Inkubacja pochodnych MS154, MS199 oraz MS200 z CT-DNA wykazała spadek intensywności widm, odpowiednio o 28,2%, 31,9%, 28,5%, a także niewielkie przesunięcie Stokesa wynoszące od 2 do 5 nm. Otrzymane wartości są zbliżone do związku referencyjnego - DOX. Mianowicie, dla doksorubicyny obserwowano silny efekt hipochromowy - 34,2%. Jedynym wyjątkiem w grupie analogów ketonu di-2-pirydyłowego jest Dp44mT, dla którego obserwowano bardzo słabą zdolność do interkalacji DNA. Wynik ten jednocześnie potwierdził wcześniejsze doniesienia innych grup badawczych [100,336]. Ponadto, dobre właściwości interkalacyjne obserwowano dla pochodnych zawierających w swej strukturze fragment chinoliny. Inkubacja pochodnych MS179, MR5K3, MR12K z CT-DNA ujawniła silny efekt hipochromowy, wynoszący odpowiednio 22,0%, 24,2% i 22,6%. Uzyskane rezultaty wskazują, że obecność obu podstruktur połączonych z ugrupowaniem tiosemikarbazonu ma kluczowe znaczenie dla obserwowanych silnych właściwości interkalacyjnych. Ponadto wykazano, że zastąpienie fragmentu dimetyloaminy (Dp44mT), piperazynowym pierścieniem aromatycznym (MS154, MS199, MS200) może znacznie poprawiać zdolności do oddziaływania z DNA [337]. Z drugiej strony, w przypadku pochodnych TSC opartych na szkielecie 8-hydroksychinoliny obserwowano umiarkowane zdolności do wiązania z DNA. Taki efekt może być związany z ich silnymi właściwościami do chelatowania jonów metali i tworzenia z nimi redoks aktywnych kompleksów. Bowiem połączenie tych własności ze zdolnością do interkalacji DNA może skutkować indukcją niewielkich uszkodzeń w dwuniciowej strukturze DNA, co z kolei prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego. Powyższa hipoteza może wyjaśniać sprzeczne dane literaturowe dotyczące oddziaływania pochodnych TSC z topoizomerezami [274,338]. Dodatkowo, jak wykazali West i in., pochodne TSC za pośrednictwem kompleksów z miedzią, mogą indukować uszkodzenia w strukturze DNA, pomimo braku zdolności do interkalacji [339].

Tabela 17. Właściwości spektralne widm absorpcji dla badanych pochodnych związanych z CT-DNA

Związek	Absorpcja λ_{\max} [nm]	Zmiana absorbancji	% hipochromizm	$\Delta\epsilon$ M⁻¹ cm⁻¹	przesunięcie widma* [nm]
MS179	282; 334	hipochromizm	22,0	3175,6	1
MR5K3	324	hipochromizm	24,2	2313,3	10
MR12K	272; 310	hipochromizm	22,6	2695,6	4
MS168	295; 330	hipochromizm	15,7	1935,6	10
MS181	295; 338	hipochromizm	9,4	1888,9	5
MS154	325	hipochromizm	28,2	4120,0	5
MS199	320	hipochromizm	31,9	6133,3	5
MS200	330	hipochromizm	28,5	3220,0	2
Dp44mT	272; 324	hipochromizm	8,2	1673,3	2
DOX	480	hipochromizm	34,2	3235,6	10

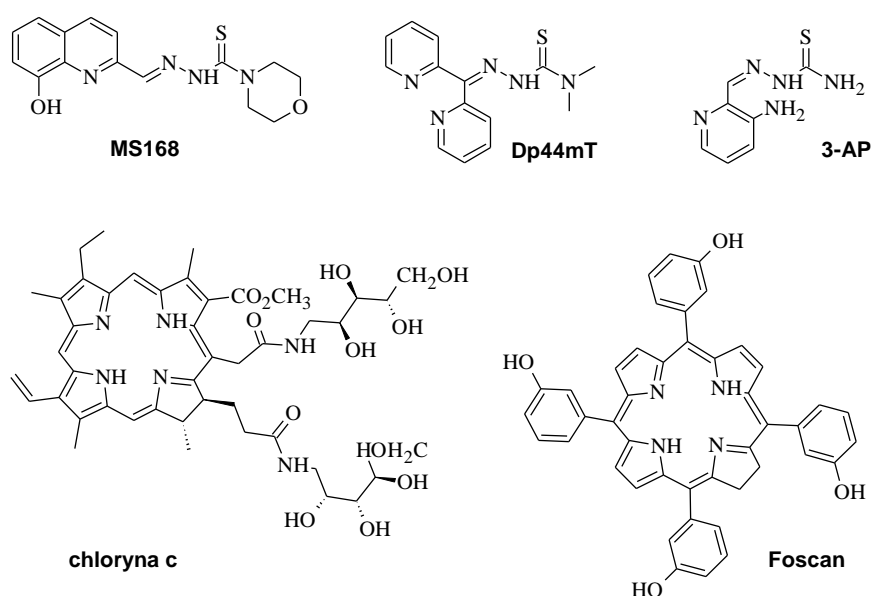
*dla długości fali przy maksimum absorpcji związku oraz ligandu-DNA.

3. Synergistyczne działanie TSC z fotouczulaczami

W strategii oparte na wywołaniu stresu oksydacyjnego może wpisywać się terapia fotodynamiczna - PDT (ang. *photodynamic therapy*). Jest ona obiecującym podejściem stosowanym między innymi w leczeniu chorób nowotworowych ze względu na wysoką selektywność względem komórek prawidłowych. Co więcej, wyraźną przewagą PDT nad innymi konwencjonalnymi metodami leczenia, jak chemioterapia i radioterapia, zyskuje dzięki minimalizacji skutków ubocznych, selektywnym gromadzeniu leku w guzie, braku zjawiska oporności, a także możliwości wielokrotnego stosowania terapii, ze względu na obniżoną toksyczność [340]. Istotą tej terapii jest połączone działanie trzech niezbędnych elementów, jakimi są fotouczulacz - PS (ang. *photosensitizer*), światło oraz tlen cząsteczkowy zawarty w obrębie tkanki nowotworowej [341]. Warto w tym miejscu podkreślić, że każdy element stosowany osobno nie wywołuje efektów toksycznych wobec komórek. Dopiero wprowadzenie i akumulacja PS w tkance, a następnie jego ekspozycja na światło o określonej długości fali, może prowadzić do wywołania zamierzonego efektu terapeutycznego. Takie działanie opiera się na indukcji szeregu reakcji fotochemicznych, w szczególności wytwarzania tlenu singletowego i innych reaktywnych form tlenu, które prowadzą do różnego rodzaju uszkodzeń, a w ostateczności eliminują guz [342]. Względny udział tych mechanizmów w końcowym efekcie zależy w dużej mierze od rodzaju i dawki PS, a także zastosowanego światła, jego dawki oraz całkowitego czasu naświetlania [343].

Ponadto połączenie terapii fotodynamicznej z konwencjonalną terapią cytostatykami może być innowacyjnym podejściem do leczenia chorób nowotworowych. Połączone działanie dwóch lub więcej środków cytotoksycznych bądź metod leczenia, może prowadzić do osiągnięcia zwiększonego efektu terapeutycznego. Oddziaływanie synergistyczne zastosowanej terapii kombinowanej, obserwujemy gdy całkowity efekt połączonego działania leków jest wyższy niż suma efektów leków stosowanych oddzielnie [344]. Wzrost aktywności i skuteczności leków stosowanych w terapii skojarzonej nie jest jedyną korzyścią, jaką możemy uzyskać w wyniku synergii farmakologicznej. Takie działanie, prowadzi również do zmniejszenia dawki stosowanych chemioterapeutyków, przy jednoczesnym zachowaniu skuteczności, a także zmniejszenia toksyczności i odporności na leki. Ostatni z wymienionych aspektów związany jest z możliwym działaniem stosowanych leków na kilka celi molekularnych. Co więcej, wiele doniesień wskazuje na możliwe wielocelowe działanie wobec różnych chorób równocześnie [344–346].

Do badań nad terapią kombinowaną z puli dotychczas analizowanych pochodnych TSC wybrano dwa najbardziej aktywne związki, MS168 oparty na fragmencie 8-hydroksychinoliny oraz Dp44mT zawierający w swej strukturze fragment ketonu di-2-pirydylowego. Szczególnie pochodna 8-hydroksychinoliny wydaje się być idealnym kandydatem do badań nad terapią skojarzoną PDT. Ostatnie badania nad terapią ALA-PDT wskazały na silny efekt synergistyczny połączonego działania MS168 z naświetloną protoporfiryną IX, która jest endogennym fotouczulaczem [347]. Dodatkowo w badaniach wykorzystano Triapinę, która ma szansę stać się pierwszym inhibitorem RR zatwierdzonym do stosowania klinicznego. Co istotne, wszystkie wybrane pochodne TSC wykazują wysoki indeks selektywności wobec komórek prawidłowych. Obecnie najczęściej stosowanymi fotouczulaczami w terapii PDT są pochodne z grupy porfiryn, chloryn, ftalocyjanin, naftalocyjanin oraz teksafiryn [348]. Ponadto, większość eksperymentalnie oraz klinicznie stosowanych PS opiera się na strukturze tetrapirołu [349]. Z tego grona pochodnych, ze względu na bardzo dobre właściwości fotofizyczne, zdecydowano się na wybór chloryny c z fragmentem cukrowym, która została zsyntezowana w grupie prof. Montfortsa [350]. Ponadto, amfifilowe własności tej pochodnej gwarantują wysoką wnikalność poprzez błonę komórkową do wnętrza komórek nowotworowych oraz dystrybucję w organizmie za sprawą układu krążenia [351,352]. Drugim badanym fotouczulaczem jest Foscan, związek oparty na pierścieniu chloryny który w 2000 roku został zatwierdzony przez FDA do stosowania w terapii fotodynamicznej w leczeniu raka płaskonabłonkowego głowy i szyi (SCCHN) [353]. Struktury wybranych pochodnych TSC oraz PS do badań nad terapią skojarzoną przedstawiono na Ryc. 24.



Ryc. 24 Struktury wybranych TSC (MS168, Dp44mT, 3-AP) oraz fotouczulaczy (chloryna c, Foscan).

Badania nad terapią kombinowaną rozpoczęto od ustalenia czasu inkubacji, optymalnego stężenia oraz kolejności podawanych związków. Bowiem, czynniki te mogą w istotny sposób wpływać na interakcje pomiędzy stosowanymi składowymi w tej terapii [354]. W rezultacie najlepszą metodą okazała się jednoczesna aplikacja pochodnych TSC oraz fotouczulaczy połączona z 24-godziną inkubacją. Aplikowane stężenia badanych związków zostały wybrane w oparciu o wcześniejsze wyniki cytotoksyczności wobec komórek linii HCT116 i są wielokrotnością wartości wyliczonego dla nich parametru IC_{50} . Następnie po wniesieniu badanych związków, komórki naświetlono światłem czerwonym o długości fali 660 nm, stosując dawkę 12 J/cm^2 . Efekt cytotoksyczny wobec komórek raka jelita grubego badano po kolejnych 24 godzinach przy pomocy testu MTS. Analizę interakcji stosowanych połączeń badanych pochodnych TSC oraz PS przeprowadzono przy pomocy programu CompuSyn, wyznaczając współczynnik kombinacji dla dawek powodujących 90 % zahamowanie wzrostu populacji komórek.

Do tej pory najbardziej rozpowszechnioną metodą stosowaną przy ilościowej ocenie zjawiska synergii jest ta zaproponowana przez Chou i Talalay, opierająca się na tzw. równaniu mediany efektu (ang. *Median Effect Equation*). Model ten opiera się na czterech podstawowych równaniach Hendersona-Hasselbalcha, Michaelisa-Mentena, Hilla i Scatcharda, które opisują zachowanie wielu układów biologicznych i oddają najbardziej jasny wzór odnoszący dawkę do efektu [355–357].

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{D_m}\right)^m$$

gdzie: D – dawka leku,

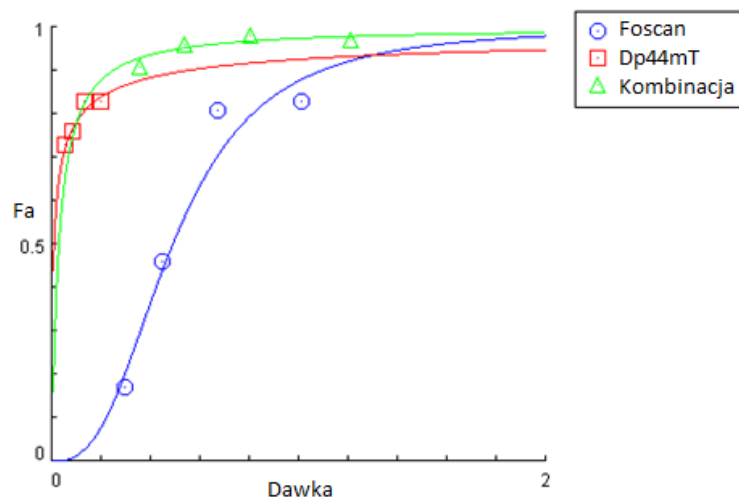
f_a – ilość populacji na którą oddziałuje dana dawka,

f_u – ilość populacji na którą nie oddziałuje dana dawka,

D_m – dawka powodująca 50 % „efekt”

m – współczynnik opisujący kształt krzywej dawka – efekt.

Przykładowy wykres zależności efektu zahamowania wzrostu populacji komórek w odpowiedzi na terapię (f_a), od stosowanej dawki pochodnej TSC - Dp44mT (oznaczone czerwonym kwadratem), Foscanu (oznaczona niebieskim kółkiem) oraz kombinacji obu składowych (zielony trójkąt) przedstawiono na Ryc. 25.



Ryc. 25 Krzywa dawki i efektu dla Dp44mT oraz Foscanu.

Na podstawie uzyskanych wyników z krzywych dawka-efekt dla pochodnych TSC oraz PS, za pomocą programu CompuSyn obliczono wartość współczynnika kombinacji - CI (ang. *Combination Index*). Jest to podstawowy parametr opisujący występujący rodzaj interakcji farmakologicznej pomiędzy dwoma lekami.

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2}$$

gdzie: D – dawka leku; D_x – dawka powodująca 50 % „efekt”.

Przyjmuje się, że gdy wynik CI jest mniejszy od 1 obserwuje się synergię, w przypadku CI równego 1 - efekt addytywny, z kolei CI większe od wartości 1 oznacza antagonizm. Jednakże, w celu ustalenia, czy dane połączenie chemioterapeutyków ma charakter synergistyczny, koniecznym jest określenie kształtu krzywej dawka-efekt (parametr m) oraz siły działania (parametr D_m). Te dwa parametry można łatwo otrzymać z równania mediany efektu. Co istotne, ze względu na bezwymiarowy charakter parametru D, dawka może być wyrażona w dowolnych jednostkach. Warto również podkreślić, że ten sposób umożliwia analizę synergii leków o nieznannej strukturze, mechanizmie działania oraz masie cząsteczkowej [356,357]. Otrzymane wartości CI dla połączonego działania badanych pochodnych TSC - MS168, Dp44mT oraz 3-AP z fotouczulaczami z grupy chloryn podano w tabeli 18. Dodatkowo, analizę

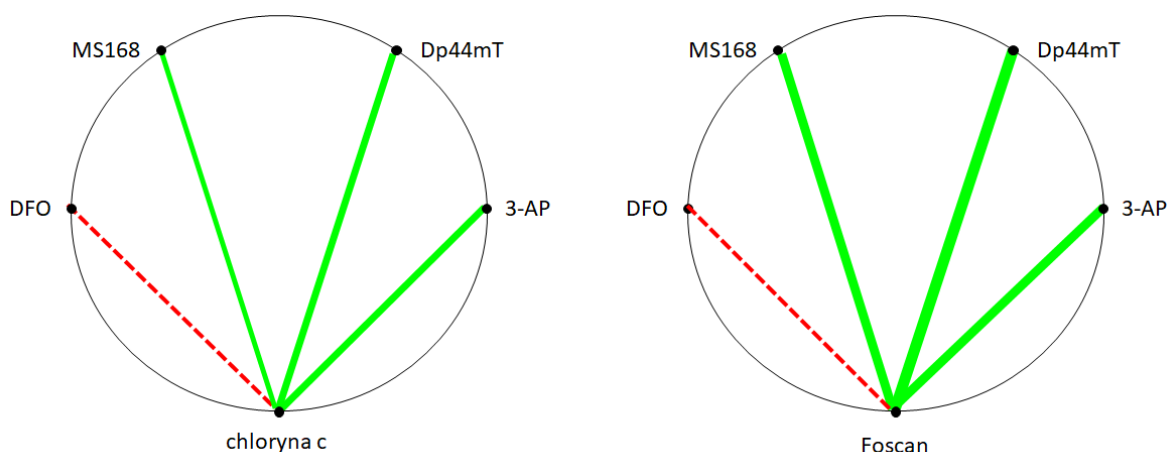
interakcji wobec chloryny c oraz Foscanu przeprowadzono wobec związku referencyjnego, chelatora żelaza - deferoksaminy (DFO).

Tabela 18. Wyliczone wartości współczynnika kombinacji dla badanych pochodnych TSC i PS

Współczynnik kombinacji (CI)^a	chloryna c	Foscan
MS168	0,82± 0,17	0,60± 0,10
Dp44mT	0,51± 0,10	0,26± 0,14
3-AP	0,59± 0,13	0,35± 0,11
DFO	1,13± 0,20	1,05± 0,19

^[a]dla Fa = 0,9; CI > 1 - antagonizm, CI = 1 - addytywność, CI < 1 – synergia.

Analiza otrzymanych wyników wskazała na działanie synergistyczne w przypadku wszystkich stosowanych kombinacji pochodnych TSC z fotouczulaczami. Najwyższy efekt obserwowano dla połączonego działania pochodnej Dp44mT z Foscanem, gdzie wyliczony parametr CI wynosił 0,26. W przypadku kombinacji pochodnej 8-hydroksychinoliny (MS168) z Foscanem obserwowano ponad 2-krotnie wyższy współczynnik kombinacji (CI = 0,6). Podobną sytuację wykazano dla kombinacji pochodnych TSC z chloryną c. Najwyższy efekt obserwowano w przypadku pochodnej Dp44mT (CI = 0,51), podczas gdy połączone działanie MS168 z chloryną c wykazywało znacznie słabsze oddziaływanie synergistyczne (CI = 0,82). Z kolei, stosowanie chelatora żelaza - deferoksaminy (DFO) ujawniło działanie addytywne/antagonistyczne w przypadku kombinacji z obydwooma fotouczulaczami z grupy chloryn. Wyniki te są szczególnie interesujące, ponieważ badane PS są związkami egzogennymi, a ich stężenie jest niezależne od poziomu żelaza. W związku z tym mechanizm interakcji różni się od działania synergistycznego obserwowanego w terapii TSC-ALA-PDT [347]. Otrzymane wyniki przedstawiono również w postaci poligonogramu, który prezentuje rodzaj i moc danego oddziaływania (Ryc. 26).



Ryc. 26 Poligonogramy przedstawiające siłę i rodzaj oddziaływania pomiędzy pochodnymi TSC oraz DFO, a fotouczulaczami. Zielona kreska oznacza synergię, z kolei jej grubość moc oddziaływania.

Jednymi z największych korzyści synergistycznego działania leków jest obniżenie dawki leków, które opisywane jest współczynnikiem redukcji dawki - DRI (ang. *Dose-Reduction Index*).

$$DRI_1 = \frac{(D_x)_1}{(D)_1} \quad DRI_2 = \frac{(D_x)_2}{(D)_2}$$

gdzie: D – dawka leku; D_x – dawka powodująca 50 % „efekt”.

Współczynnik ten dostarcza informacji na temat tego, ile razy można zmniejszyć dawkę każdego z leków, aby osiągnąć rezultaty, które są porównywalne do efektu ich działania oddzielnego. Takie działanie umożliwia minimalizację skutków ubocznych, przy jednoczesnym zachowaniu skuteczności stosowanych leków w terapii skojarzonej [356].

Za pomocą oprogramowania CompuSyn wyliczono wartości współczynnika DRI dla pochodnych TSC w terapii kombinowanej z fotouczulaczami, dla uzyskania takiego samego efektu 90% skuteczności jak w przypadku stosowanego samego TSC. Jak pokazuje tabela 19, najwyższy efekt można uzyskać dla pochodnej MS168. W przypadku terapii kombinowanej z chloryną c prawie 16-krotne zmniejszenie dawki wywołuje efekt podobny do 90% skuteczności stosowanego samego związku. Z kolei, dla połączonego działania MS168-Foscan, efekt ten można uzyskać w wyniku 19-krotnego zmniejszenia dawki TSC. Równie wysoki

współczynnik DRI obserwowano dla pochodnej Dp44mT opartej na fragmencie ketonu di-2-pirydylowego w terapii kombinowanej z Foscanem.

Tabela 19. Wyliczone wartości współczynnika redukcji dawki dla badanych pochodnych TSC

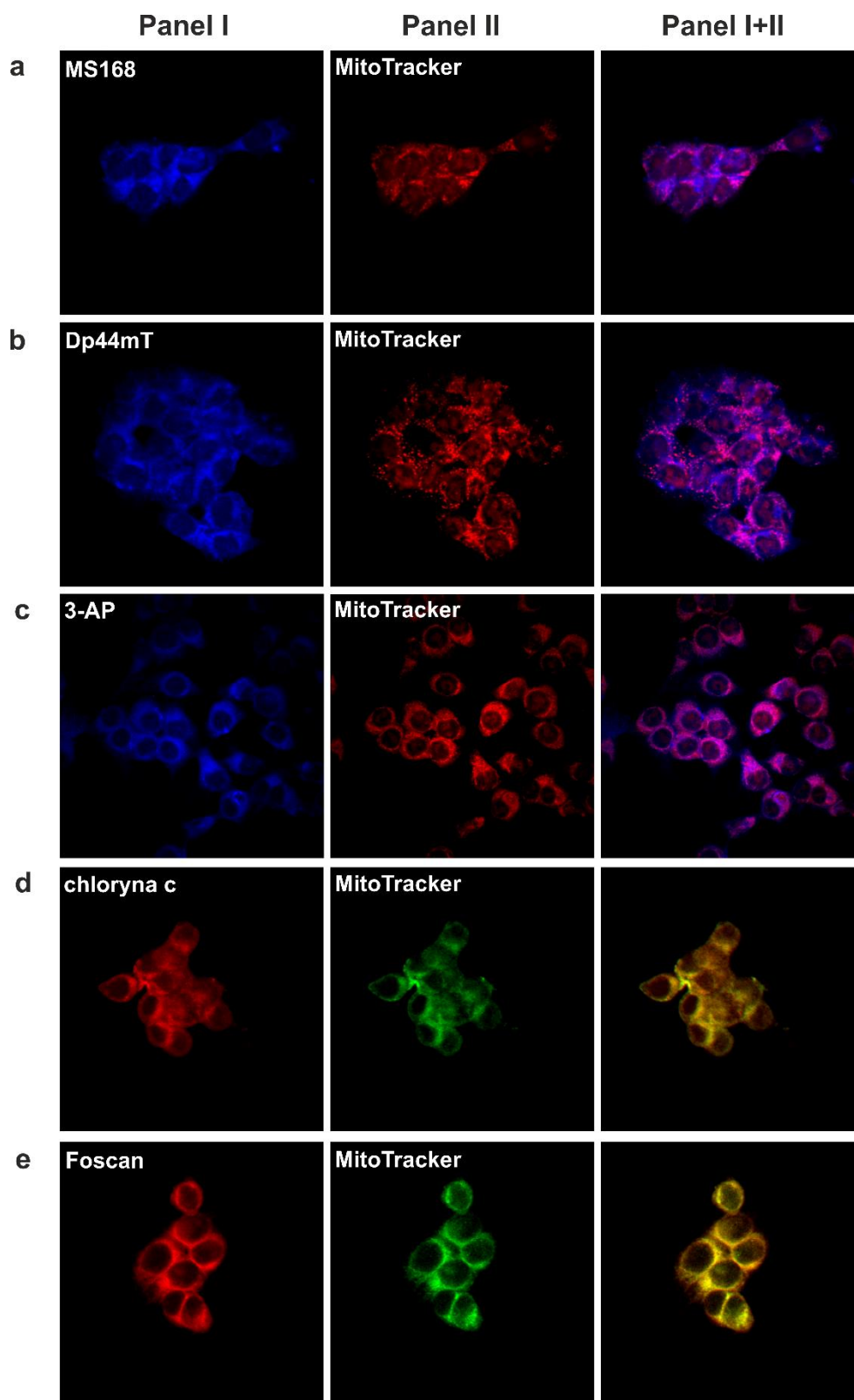
Współczynnik DRI dla chelatorów^a	chloryna c	Foscan
MS168	15,58	18,78
Dp44mT	7,67	13,16
3-AP	1,91	2,71

^[a]dla Fa = 0,9

Podsumowując, obserwowany synergistyczny efekt pomiędzy badanymi pochodnymi TSC oraz fotouczulaczami w terapii PDT, może opierać się na indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach. Takie działanie może być związane ze zdolnością obu grup związków do generowania reaktywnych form tlenu, a tym samym wpływu na komórkowy system obrony antyoksydacyjnej. Z kolei, wyjaśnieniem obserwowanego efektu addytywnego bądź antagonistycznego w przypadku stosowanego DFO w terapii PDT, jest brak możliwości uczestnictwa w reakcji Fentona. Wynika to z heksadentnego charakteru tego ligandu, który posiada zapełnioną sferę koordynacji, tym samym uniemożliwiając dostęp nadtlenkowi wodoru do centralnego atomu żelaza [239]. Co więcej, w wysokich stężeniach DFO jest znany ze swoich właściwości antyoksydacyjnych [358]. Jednakże, w celu dokładnego zweryfikowania tych hipotez przeprowadzono kolejne eksperymenty określające lokalizację badanych pochodnych TSC oraz PS w komórkach raka jelita grubego, a także ich wpływ na regulację genów odpowiedzialnych za utrzymanie wewnątrzkomórkowej homeostazy potencjału redoks.

3.1 Lokalizacja wewnątrzkomórkowa TSC i fotouczulaczy

W celu określenia wewnątrzkomórkowej lokalizacji badanych pochodnych TSC oraz fotouczulaczy wykonano barwienie ze specyficznymi markerami wiążącymi się do mitochondriów. Warunkiem koniecznym poprawnego przeprowadzenia analizy kolokalizacji jest staranne dobranie odpowiednich barwników. W niniejszym eksperymencie ze względu na różną długość fali promieniowania wzbudzającego i emitowanego badanych pochodnych TSC oraz fotouczulaczy, zastosowano dwa markery fluorescencyjne. Analizę przeprowadzono po 24-godzinnej inkubacji z badanymi pochodnymi w komórkach HCT116 przy pomocy skaningowej mikroskopii konfokalnej. Wyniki przedstawiono na Ryc. 27.



Ryc. 27 Wewnątrzkomórkowa lokalizacja pochodnych TSC: MS168 (a), Dp44mT (b), 3-AP (c) oraz fotouczulaczy: chloryny c (d), Foscanu (e) w komórkach linii HCT116. Panel I - fluorescencja badanych pochodnych; Panel II - fluorescencja stosowanego markera do wybarwienia mitochondriów (MitoTracker Orange w przypadku TSC, MitoTracker Green w przypadku PS); Panel I+II - nałożenie odpowiednich obrazów. Skala = 50 μ m.

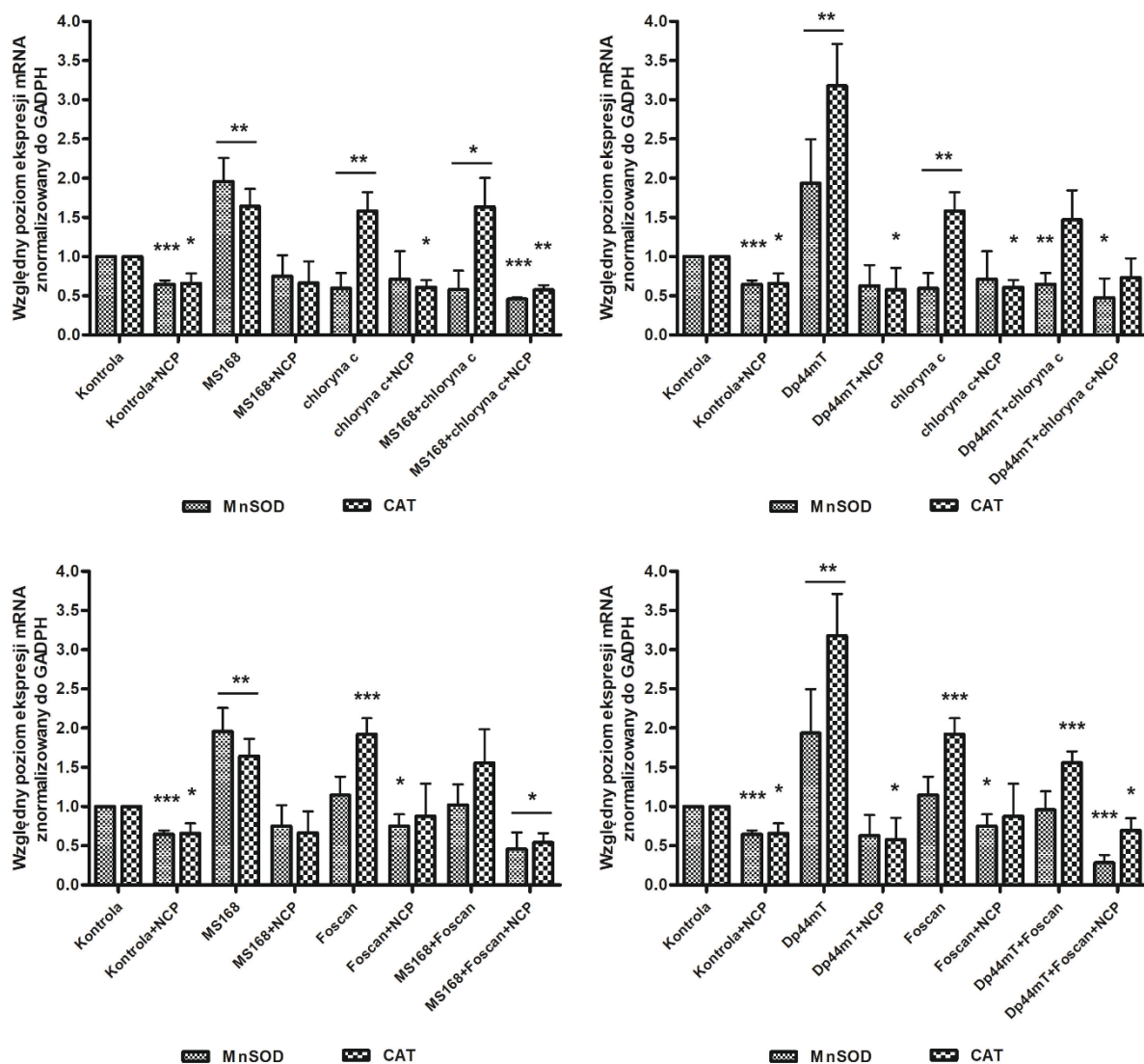
Po inkubacji z wszystkimi trzema pochodnymi TSC obserwowano niebieski sygnał fluorescencji w komórkach. Do analizy kolokalizacji z tymi związkami użyto barwnika Mitotracker Orange, którego maksimum absorpcji występuje przy 554 nm, a emisji przy 576 nm. Analiza nałożonych zdjęć uzyskanych podczas rejestracji fluorescencji dla TSC oraz barwnika wskazała na lokalizację (kolor różowy) tych pochodnych w obrębie mitochondriów. Dodatkowo wydaje się, że pochodne TSC mogą wykazywać powinowactwo do innych struktur komórkowych, co potwierdzają inne doniesienia [271,359]. Z kolei, w przypadku inkubacji z fotouczulaczami z grupy chloryn, w komórkach obserwowano czerwony sygnał fluorescencji. Z tego względu, do wybarwienia mitochondriów użyto barwnika Mitotracker Green, którego widmo absorpcji charakteryzuje się maksimum występującym przy 490 nm, natomiast maksimum emisji obserwuje się przy 516 nm. Również, w tym przypadku analiza nałożonych obrazów wskazała na akumulację badanych fotouczulaczy w tych kompartmentach komórki, o czym świadczy żółty kolor.

Uzyskane rezultaty w tym eksperymencie wskazują na lokalizację wszystkich badanych związków w mitochondriach. Wydaje się to kluczowe, z uwagi na ich możliwy komplementarny mechanizm działania oparty na wywoływaniu stresu oksydacyjnego w komórkach. Bowiem, jak wskazano w poprzednich badaniach, mechanizm działania pochodnych TSC może opierać się na generowaniu ROS w reakcji Fentona i Haber-Weissa, które wpływają na zdolność antyoksydacyjną komórek. Ponadto, pochodne TSC poprzez swoje zdolności do chelatowania jonów żelaza, mogą wpływać na zmiany labilnej puli tego pierwiastka w mitochondriach. Z kolei, takie działanie może być powiązane z efektywnością terapii kombinowanej PDT. Jak wykazali Hugh i in., w przypadku stosowania fotouczulacza ftalocyjaninowego PC-4, poziom mitochondrialnego żelaza wpływał na ogólną skuteczność PDT w komórkach raka głowy i szyi (UMSCC1) [360]. Co więcej, mechanizm cytotoksyczności terapii PDT również opiera się na indukcji reaktywnych form tlenu. Mianowicie, absorpcja fotonów przez fotouczulacz dostarcza wystarczającej energii, aby ten ze swojego stanu podstawowego przeszedł do stanu trypletowego. W tym stanie może ulegać dalszym reakcjom, które prowadzą do przeniesienia energii z PS na tlen, co przyczynia się do powstawania silnie reaktywnego tlenu singletowego [361,362]. Ponadto, jak wykazał Chen i in., Foscan posiada silną zdolność do generowania anionorodnika ponadtlenkowego, co przedkłada się na jego wysoką skuteczność w stosowanej terapii [363]. Z uwagi na krótki okres półtrwania reaktywnych form tlenu, ich reakcje są bardzo szybkie i powodują uszkodzenia w pobliżu miejsca ich wytwarzania. Zatem, akumulacja związków w komórce odgrywa

kluczową rolę w skuteczności terapii fotodynamicznej [353,354]. Wszystkie te przesłanki, mogą skłaniać do ogólnego wniosku, że kombinacja pochodnych TSC z fotouczulaczami poprzez wspólne generowanie różnych form wolnych rodników, może wpływać na zdolność antyoksydacyjną komórek. Zmiany w ekspresji genów związanych z obroną antyoksydacyjną są typową odpowiedzią na leczenie różnymi cytostatykami, a także stosowaną terapię PDT [364,365].

3.2 Wpływ TSC i fotouczulaczy na ekspresję genów związanych z obroną antyoksydacyjną

Wpływ badanych pochodnych TSC, PS oraz ich kombinacji na ekspresję genów odpowiedzialnych za utrzymanie równowagi oksydacyjnej w komórkach oznaczono metodą PCR w czasie rzeczywistym w trzech niezależnych eksperymentach. Analizę przeprowadzono po 30-godzinach inkubacji z badanymi pochodnymi, w tym po 6 godzinach od naświetlenia komórek linii HCT116 światłem czerwonym - 660 nm w dawce 12 J/cm². Dodatkowo analizę zmian ekspresji genów po traktowaniu badanymi pochodnymi i ich kombinacjami przeprowadzono w obecności neokuproiny (NCP), która jest wygaszaczem reaktywnych form tlenu w komórkach. Otrzymane wyniki przedstawiono w formie wykresów na Ryc. 28.



Ryc. 28 Wpływ badanych pochodnych TSC, PS oraz ich kombinacji na ekspresję genów MnSOD, CAT w komórkach linii HCT116. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów. Dane analizowano przy pomocy testu-t Studenta: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli (komórki naświetlone, nietraktowane).

Analiza otrzymanych wyników ujawniła wzrost poziomu ekspresji obu badanych genów po traktowaniu komórek Foscanem. W przypadku inkubacji z drugim fotouczulaczem - chloryną c odnotowano znaczny wzrost poziomu ekspresji katalazy w komórkach w odniesieniu do kontroli. Odminną sytuację wskazano dla MnSOD, gdzie obserwowano niewielki spadek poziomu tego genu. Dalsza analiza wskazała na znaczny wzrost poziomu ekspresji MnSOD i CAT w komórkach po inkubacji z badanymi pochodnymi TSC. W przypadku genu dysmutazy ponadtlenkowej dla obu pochodnych obserwowano ponad

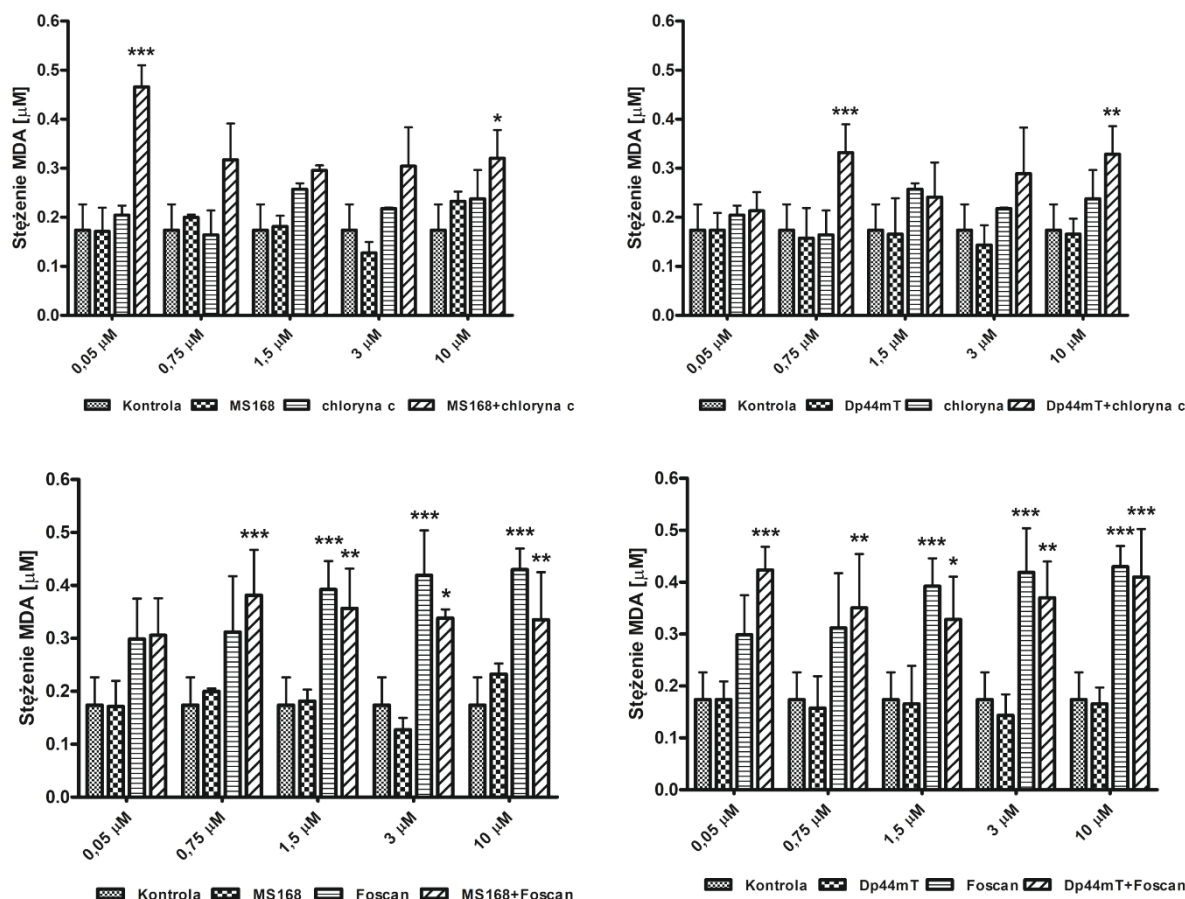
2-krotne zwiększenie poziomu tego genu w komórkach. Z kolei, dla genu katalazy, najwyższy efekt obserwowano po inkubacji z Dp44mT, gdzie wykazano ponad 3-krotny wzrost poziomu ekspresji tego genu w komórkach w odniesieniu do kontroli. W przypadku stosowanych kombinacji TSC z PS zauważa się, że poziom badanych genów jest porównywalny do sytuacji z samymi fotouczulaczami. Wyniki te mogą wskazywać na fakt, iż obserwowane zmiany są obrazem odpowiedzi komórki rejestrowanej w tak krótkim czasie. Jak wspomniano wcześniej, eksperyment polegał na 24-godzinnej inkubacji z TSC i PS, naświetleniu i zbadaniu efektu po kolejnych 6 godzinach. Wydaje się, że diametralna zmiana systemu komórkowej równowagi redoks obserwowana jest w przeciągu tych 6 godzin od naświetlenia komórek. Kluczową rolę w tym efekcie odgrywają generowane ROS przez PS. Znajduje to odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach wskazujących na brak różnic w ekspresji genów w odpowiedzi na monoterapię (PS) i terapię kombinowaną (PS+TSC). Jedynym wyjątkiem, jest kombinacja Dp44mT z Foscanem, gdzie obserwowano silniejszy wpływ na poziom ekspresji CAT w odniesieniu do samej terapii PDT. Warto zauważyć, że efekt ten korelował z wyliczonym CI. Ponadto należy zauważyć, że we wszystkich przypadkach w obecności NCP widoczny jest znaczny spadek poziomu ekspresji obu badanych genów w komórkach raka jelita grubego.

Podsumowując, uzyskane rezultaty w tym eksperymencie wskazują, że zastosowanie kombinacji dwóch związków, które generują reaktywne formy tlenu, może wpływać na załamanie komórkowego potencjału redoks. Pochodne TSC w wyniku chelatowania jonów metali generują ROS, wpływając początkowo na zwiększenie ekspresji elementów systemu obrony antyoksydacyjnej, których zadaniem jest zmniejszenie stężenia wolnych rodników w komórce. Nieznacznie niższy efekt obserwuje się w przypadku badanych fotouczulaczy. Zwiększona produkcja wolnych rodników w mitochondriach powoduje zwiększenie stężenia nadtlenu wodoru, co prowadzi do zwiększenia ekspresji CAT, odpowiedzialnej za detoksykację tej formy nierodnikowej ROS [366]. Zatem, obniżenie ekspresji tych genów przez pochodne TSC może wpływać na zwiększenie efektywności terapii. Ponadto jak wykazano we wcześniejszych badaniach, takie działanie wydaje się kluczowe dla załamania obrony antyoksydacyjnej komórki, w efekcie czego dochodzi do indukcji apoptotycznych szlaków sygnalizacyjnych. Z drugiej strony, w przypadku fotouczulaczy obserwowany zwiększony poziom tego genu może wpływać na nasilenie procesu PDT [367].

3.3 Wpływ TSC i fotouczulaczy na peroksydację lipidów

Załamanie wewnątrzkomórkowego potencjału redoks poprzez znaczne obniżenie ekspresji genów odpowiedzialnych za obronę antyoksydacyjną może prowadzić do indukcji stresu oksydacyjnego, który wywołuje wiele uszkodzeń komórkowych. Jednymi z najbardziej podatnych komponentów na uszkodzenia wywołane generowaniem ROS są błony komórkowe [101]. W nich dochodzi do procesu peroksydacji lipidów wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), co może prowadzić do zmian w przepuszczalności i płynności dwuwarstwy lipidowej. Takie działanie w efekcie końcowym prowadzi do utraty integralności błon komórkowych, w tym również mitochondrialnych [368,369]. Głównymi produktami procesu utleniania lipidów są wodoronadtlenki lipidów oraz powstające jako produkty uboczne aldehydy, takie jak malonyldialdehyd (MDA), propanal, heksanal oraz 4-hydroksynonenal. Obecnie, MDA jest szeroko stosowanym markerem procesu peroksydacji lipidów [368].

Wpływ badanych pochodnych TSC, PS oraz ich kombinacji na procesy utleniania lipidów w komórce monitorowano przy pomocy kolorymetrycznej metody TBARS (ang. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Metoda ta oparta jest na reakcji powstającego w procesie peroksydacji lipidów - MDA z kwasem tiobarbiturowym w kwasowym środowisku i temperaturze 90 °C. Ilość powstałego w reakcji produktu jest oznaczona spektrofotometrycznie oraz proporcjonalna do stężenia MDA w badanej próbce. Analizy przeprowadzono po 27-godzinach inkubacji z badanymi związkami, w tym po 3 godzinach od naświetlenia komórek linii HCT116 światłem czerwonym - 660 nm w dawce 12 J/cm². Otrzymane wyniki przedstawiono na Ryc. 29.



Ryc. 29 Wpływ badanych pochodnych TSC, PS oraz ich kombinacji na peroksydację lipidów w komórkach linii HCT116. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów. Dane analizowano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w porównaniu do kontroli (komórki naświetlone, nietraktowane).

Analiza otrzymanych wyników ujawniła, że po traktowaniu komórek badanymi kombinacjami TSC z fotouczulaczami obserwowany jest znacznie wyższy poziom stężenia malonyldialdehydu w odniesieniu do samych TSC. W przypadku stosowanych fotouczulaczy, można zauważyć ciekawe zależności. Po inkubacji z Foscanem obserwowano znaczny wzrost stężenia malonyldialdehydu w odniesieniu do komórek kontrolnych. Podobny efekt obserwowano w przypadku chloryny c, lecz w znacznie mniejszym stopniu. Wy tłumaczeniem tego faktu, może być wyższa fotocytotoksyczność Foscanu wobec komórek raka jelita grubego, niż w przypadku chloryny c. Z drugiej strony, dla kombinacji TSC z chloryną c odnotowano większy wzrost stężenia produktu peroksydacji lipidów w odniesieniu do monoterapii PDT.

W przypadku kombinacji pochodnych TSC z Foscanem, wyższy efekt peroksydacji lipidów wskazano jedynie dla niskich stężeń aplikowanych składowych. Uzyskane rezultaty mogą być związane z obserwowanym efektem śmiertelnym w komórkach po zastosowaniu wysokich stężeń TSC+Foscan.

Powstające addukty MDA w reakcji peroksydacji lipidów mogą odgrywać dalszą rolę w progresji śmierci komórkowej. Albowiem malonyldialdehyd może wchodzić w reakcje z białkami przekształcając reszty aminokwasowe w pochodne karbonylowe. Ponadto, oddziaływanie z DNA, może prowadzić do wielu uszkodzeń helisy, a w konsekwencji do hamowania procesów replikacji oraz transkrypcji DNA [368]. Najnowsze badania wskazują, że akumulacja produktów peroksydacji lipidów może być przyczyną śmierci komórkowej zależnej od żelaza - ferroptozy [370].

IV. PODSUMOWANIE

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono analizę aktywności antyproliferacyjnej dla 103 nowych pochodnych tiosemikarbazonu zsyntezowanych przez mgr Martę Rejmund z Zakładu Chemii Organicznej. Ponadto, przeprowadzono dodatkową charakterystykę dla 7 najbardziej aktywnych pochodnych TSC zawierających fragment chinoliny lub dipirydylowy, otrzymanych przez dr inż. Macieja Serdę. Łącznie przebadano 110 związków wobec różnych typów komórek nowotworowych. Wszystkie nowo zsyntezowane pochodne zostały scharakteryzowane pod względem aktywności biologicznej wobec dwóch linii komórek raka jelita grubego - HCT116 typu dzikiego oraz mutantów z nokautem genu TP53. Dla związków wykazujących w tych testach wysoką aktywność, rozszerzono profil badań o oznaczenia wobec komórek dwóch linii glejaków (U-251, Hs 683) oraz raka piersi - MCF-7. Dla wszystkich nowo zsyntezowanych związków wykazujących aktywność biologiczną poniżej 25 μM wykonano testy cytotoksyczności wobec komórek prawidłowych fibroblastów, celem określenia ich selektywności. Dla wspomnianych związków zsyntezowanych przez dr inż. Serdę, wykonano oznaczenia względem komórek raka piersi.

Analiza cytotoksyczności ujawniła, że zdecydowana większość pochodnych tiosemikarbazonu opartych na fragmentach chinoliny, 8-hydroksychinoliny, ketonu di-2-pirydylowego, pirydyno-2-karboksyaldehydu oraz 3-aminopirydyno-karboksyaldehydu charakteryzuje się wysoką aktywnością biologiczną wobec badanych komórek linii nowotworowych. Ponadto, analiza zależności struktura aktywność wskazała, że dołączenie grupy trifluorometylowej lub atomów halogenu do terminalnego pierścienia aromatycznego skutkuje poprawą aktywności biologicznej. Z kolei, modyfikacje w obrębie pierścienia pirydylowego, polegające na wprowadzeniu atomu bromu lub grupy hydroksylowej prowadzą do spadku aktywności i selektywności. Wskazano również, że w przypadku pochodnych opartych na pierścieniach fenolu, metoksyfenolu, fluorobenzenu, nitrobenzenu utrata aktywności biologicznej wobec badanych komórek raka jelita grubego, wiązała się z brakiem heteroatomu w pierścieniu oraz prawdopodobnie utratą zdolności do kompleksowania jonów metali.

W kolejnym etapie wybrano 9 najbardziej aktywnych związków do dalszych mających na celu wyjaśnienie molekularnego mechanizmu działania pochodnych TSC oraz ich możliwego zastosowania w terapiach opartych na wywołaniu stresu oksydacyjnego.

W tym celu, najpierw określono wpływ jonów metali - żelaza oraz miedzi na cytotoksyczność badanych pochodnych TSC wobec komórek raka jelita grubego oraz piersi. Wyniki wskazały na dwa możliwe mechanizmy oddziaływania pochodnych TSC z badanymi jonami. Mianowicie wykazano, że ogólny efekt cytotoksyczności tych pochodnych obserwowany w obecności jonów żelaza może wiązać się z ich zdolnościami do chelatowania jonów metali, a także wynikać z wrażliwości komórek na zmiany stężenia żelaza oraz reaktywnych form tlenu. Z kolei, w obecności jonów miedzi potwierdzono właściwości jonoforyczne badanych pochodnych.

Następnie przeprowadzono szereg badań określających wpływ TSC na zaburzenie potencjału redoks w komórkach oraz indukcję śmierci komórkowej poprzez apoptozę. Najpierw wykonano testy określające generowanie reaktywnych form tlenu w komórkach raka jelita grubego, które potwierdziły wcześniejsze doniesienia dla tej klasy związków. Ponadto, analiza ilościowa ujawniła, wzrost stężenia reaktywnych form tlenu w komórkach, z maksimum po 12 godzinach od aplikacji badanych pochodnych. Obserwowany efekt wiązał się z odpowiedzią komórki na zaburzenie równowagi redoks, co ujawnił spadek poziomu zasobów glutationu - głównego elementu systemu antyoksydacyjnego po 24 godzinach od aplikacji badanych pochodnych. Ponadto, przeprowadzona analiza ekspresji genów odpowiedzialnych za utrzymanie równowagi oksydacyjnej ujawniła początkowy wzrost, a następnie drastyczny spadek poziomu genów MnSOD i CAT po inkubacji z badanymi pochodnymi. Takie zachowanie komórki świadczy o początkowej walce o utrzymanie prawidłowej homeostazy. Jednakże, z czasem inkubacji, badane pochodne powodują załamanie komórkowego potencjału antyoksydacyjnego komórek w połączeniu z generowaniem ROS. Jak wskazano, efekt ten silnie korelował z aktywnością antyproliferacyjną badanych pochodnych względem raka jelita grubego. Z tego względu, można wnioskować, że udział pochodnych TSC w reakcjach Fentona i Haber-Weissa, oraz wpływ na zakłócenie obrony systemu antyoksydacyjnego komórki są głównymi mechanizmami działania tych związków, prowadzącymi do indukcji apoptozy. Uruchomienie szlaków odpowiedzialnych za wywołanie apoptozy, potwierdzono przy pomocy analizy ekspresji genu *Ndr1*, a także białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego oraz indukcję tego typu śmierci komórkowej. Pomimo silnego związku pomiędzy metabolizmem żelaza, a aktywacją białka p53, wszystkie badane związki wyzwały apoptozę komórek poprzez aktywację białka p21, na drodze niezależnej od p53. Ponadto, przeprowadzona analiza cyklu komórkowego ujawniła zablokowanie przejścia pomiędzy fazami G1/S po inkubacji z wszystkimi 9 badanymi TSC, a także pomiędzy fazami G2/M po

traktowaniu pochodnymi TSC opartymi na szkielecie 8-hydroksychinoliny. Dla wszystkich badanych związków, potwierdzono również zdolność do oddziaływania z DNA na drodze interkalacji, co może indukować uszkodzenia kwasów nukleinowych.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej, zbadano również możliwość stosowania pochodnych TSC jako adjuwantów w terapii fotodynamicznej PDT, która również opiera się na generowaniu reaktywnych form tlenu. Testy zostały przeprowadzone dla trzech związków TSC oraz dwóch fotouczulaczy z grupy chloryn. Otrzymane wyniki potwierdziły działanie synergistyczne dla wszystkich stosowanych połączeń pochodnych TSC oraz PS. W kolejnym etapie badań potwierdzono możliwy mechanizm działania synergistycznego, wskazując na podobną akumulację badanych składników w komórce oraz możliwość generowania różnych reaktywnych form tlenu, które wpływają na zaburzenie potencjału antyoksydacyjnego komórki. Ponadto, potwierdzono działanie cytotoksyczne generowanych ROS przez TSC+PS na komórkę, poprzez oznaczenie produktów peroksydacji lipidów, które odgrywają istotną rolę w progresji śmierci komórkowej. Zatem, uzyskane wyniki wskazały na komplementarny mechanizm działania pochodnych TSC oraz PS oparty na wywołaniu stresu oksydacyjnego.

Chelatory żelaza stanowią ważną grupę środków przeciwnowotworowych. Dwa związki z tej grupy znajdują się obecnie w fazie badań klinicznych. Kolejne pochodne, w tym uwzględnione w niniejszej pracy mają szansę również wkroczyć w tę fazę badań. Tymczasem brak pełnych informacji na temat mechanizmów działania znacznie utrudnia badania implementacyjne. Dlatego tematyka podjęta w tej pracy stanowi ważny czynnik poznania biochemii związków z tej klasy. Otrzymane wyniki mogą przyczynić się w znacznym stopniu do kolejnej fazy badań w warunkach *in vivo*. Potwierdzony w ramach badań wielowątkowy mechanizm działania stawia w nowym świetle możliwości stosowania chelatorów żelaza jako samodzielnych leków lub w połączeniu z innymi w ramach terapii kombinowanych. Ponadto opisane zależności struktura-aktywność mogą służyć jako wskaźniki do projektowania nowych związków, które mogą charakteryzować się lepszą aktywnością antyproliferacyjną i oczekiwaną selektywnością.

V. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. Aparatura

Pomiary spektrofotometryczne zostały wykonane na spektrofotometrze U-2900 (Hitachi), czytniku płytek wielodołkowych Synergy4 (Bio-Tek) oraz NanoDrop 2000 (ThermoFisher).

Do oceny morfologii komórek niezbędnej do prowadzenia hodowli wykorzystano mikroskop odwrócony Olympus CKX31.

Liczba komórek niezbędna do posiewów była ustalana za pomocą licznika komórek TC10 (Bio-Rad).

Obrazy komórek wybarwionych uzyskano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX81 wyposażonego w kamerę Hamamatsu C10600 oraz komorę inkubacyjną, a także przy pomocy systemu konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej Olympus Fluoview FV1000 sprzężonej z mikroskopem odwróconym Olympus IX81.

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w termocyklerze C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad).

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono na urządzeniu CTX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Chemiluminescencyjną detekcję białek na membranie nitrocelulozowej wykonano na transiluminatorze ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad).

Badania dotyczące cyklu komórkowego oraz detekcji apoptozy przeprowadzono z wykorzystaniem cytometrii przepływowej na urządzeniu Muse Cell Analyzer (Millipore).

Ponadto korzystano ze standardowego wyposażenia pracowni biologicznych niezbędnego do utrzymania hodowli komórkowej *in vitro*.

2. Odczynniki wykorzystywane w badaniach *in vitro*

5-fluorouracyl (Sigma-Aldrich), bufor do elektroforezy SDS-Page - NuPAGE™ Running Buffer (10X) (ThermoFisher), bufor do transferu białek na membranę - NuPAGE Transfer Buffer (20X) (ThermoFisher), buforowany roztwór soli fizjologicznej - Dulbecco's Phosphate

Buffered Saline (PBS) bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (Sigma-Aldrich), chemiluminescencyjny odczynnik do detekcji białek - SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), chloroform (POCH), Deferazyroks (Sigma-Aldrich), dimetylosulfotlenek – DMSO (POCH), dodecylosiarczan sodu – SDS (Sigma-Aldrich), Doksorubicyna (Sigma-Aldrich), EDTA (ThermoFisher), etanol 99,9% (POCH), gentamycyna (Roth), Irynotekan (Sigma-Aldrich), izopropanol (POCH), koktail inhibitorów fosfataz - Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific), koktail inhibitorów proteaz - Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific), kwas 2-tiobarbiturowy - TBA (Sigma-Aldrich), kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) (DNTB) (Sigma-Aldrich), kwas solny – HCl (POCH), kwas sulfosalicylowy (Sigma-Aldrich), kwas trichlorooctowy - TCA (Sigma-Aldrich), metanol (POCH), nadsiarczan amonu - APS (ThermoFisher), nadtlenek wodoru - H_2O_2 (POCH), N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina - TEMED (ThermoFisher), neokuproina (2,9-dimetylo-1,10-fenantrolina, NCP) (Sigma-Aldrich), obciążnik próbek do elektroforezy SDS-Page - NuPAGE™ LDS Sample Buffer 4× (ThermoFisher), odczynnik do barwienia jąder - Hoechst 33342 (Molecular Probes™), odczynnik do barwienia mitochondrów MitoTracker® Orange CMTMRos oraz MitoTracker® Green FM (Molecular Probes™), odczynnik do detekcji apoptozy - Annexin V & Dead Cell Kit (Millipore), odczynnik do detekcji reaktywnych form tlenu - CellROX® Green Reagent (Molecular Probes™), odczynnik do izolacji białek - RIPA buffer (Thermo Scientific), odczynnik do izolacji RNA z hodowli komórkowych - TRIzol Reagent (Ambion), odczynnik do pomiaru stężenia białka - Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific), odczynnik do pomiaru odsetek komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego - Muse Cell-Cycle Kit (Millipore), odczynnik do odwrotnej transkrypcji - GoScript™ Reverse Transcriptase kit (Promega), odczynnik do techniki PCR w czasie rzeczywistym - PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) oraz SYBR Green Mix (Bio-Rad), odczynnik do testu MTS - CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), Oksaliplatyna (Sigma-Aldrich), oligonukleotydy - Oligo(dT)₂₀ Primers (ThermoFisher) oraz Oligo(dT)₂₃ Primers (Sigma-Aldrich), paraformaldehyd (Sigma-Aldrich), pożywka hodowlana - Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (DMEM) z czerwienią fenolową oraz bez czerwieni fenolowej (Sigma-Aldrich), przeciwciała pierwszorzędowe oraz drugorzędowe skoniugowane z peroksydazą chrzanową katalizującą reakcję luminescencyjną (Cell Signaling), reduktaza glutationu (GR) (Sigma-Aldrich), resweratrol (Sigma-Aldrich), standardowy DNA wyizolowany z grasicy cielęcej (ang. *calf-thymus DNA* - CT-DNA), surowica płodów wołowych – FBS (ang. *fetal bovine serum*) (Gibco), środek redukujący mostki disiarczkowe - ditiotreitrol (DTT)

(ThermoFisher), Triapina (tiosemikarbazon 3-aminopirydyno-2-karboksyaldehydu, 3-AP) (Sigma-Aldrich), Tris (ThermoFisher), Triton-X (Sigma-Aldrich), trypsyna r-r EDTA (Sigma-Aldrich), Tween-20 (Sigma-Aldrich), woda o wysokiej czystości do biologii molekularnej (ThermoFisher), wodorotlenek sodu - NaOH (POCH), zredukowany fosforan dinukleotydu β -nikotynoamidoadeninowego - β -NADPH (Sigma- Aldrich).

3. Linie komórkowe

Badania aktywności biologicznej związków wykonano na panelu nowotworowych linii komórkowych:

HCT116 p53^{+/+} - ludzki gruczolakorak jelita grubego (okrężnicy) typ dziki

HCT116 p53^{-/-} - ludzki gruczolakorak jelita grubego (okrężnicy) z nokautem genu TP53, kodującego białko p53

MCF-7 - ludzki gruczolakorak piersi

U-251 - ludzki glejak wielopostaciowy mózgu

Hs 683 - ludzki glejak mózgu

W badaniach wykorzystano również linię komórek prawidłowych typu fibroblast - NHDF, wyizolowanych ze skóry.

Linie komórkowe HCT116 p53^{+/+}, MCF-7, Hs 683 zostały pozyskane z banku komórek ATCC. Linię komórkową HCT116 p53^{-/-} pozyskano z Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie (Oddział w Gliwicach). Natomiast linię komórkową U-251 zakupiono z Sigmy-Aldrich, a NHDF z PromoCell.

4. Hodowla komórkowa

Hodowle komórkowe prowadzono w warunkach jałowych, w sterylnych, jednorazowych butelkach hodowlanych 75 cm³ (Nunc). Komórki hodowano w kompletnym medium wzrostowym DMEM F-12, wzbogaconym inaktywowaną termicznie surowicą płodów wołowych (FBS) - 12 % v/v w przypadku linii nowotworowych HCT116, MCF-7, U-251,

Hs 683, oraz nieinaktywowaną surowicą - 15 % v/v dla linii prawidłowej NHDF. Ponadto medium zawierało antybiotyk gentamycynę w standardowych ilościach (100 µg/mL pożywki). Hodowle komórkowe prowadzono w standardowych warunkach inkubatorów CO₂ (temperatura 37 °C, 5 % CO₂, 95 % wilgotności względnej). Hodowlę komórkową utrzymywano w fazie wzrostu logarytmicznego poprzez regularne pasażowanie przy użyciu 0,05 % roztworu trypsyny, po osiągnięciu przez hodowlę ok. 80 % konfluencji.

5. Ocena cytotoksyczności badanych pochodnych

Ocenę toksyczności badanych związków przeprowadzono przy pomocy kolorymetrycznego testu MTS. W tym celu komórki wysiano na 96-dołkowe płytki w liczbie odpowiedniej dla danej linii komórkowej oraz czasu inkubacji z badanymi pochodnymi (Tabela 20.), a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37 °C, 5 % CO₂. Po tym czasie, wzrastające stężenia badanych związków podano na płytki, a komórki poddano 72 lub 96 - godzinnej inkubacji. Roztwory wyjściowe przygotowano w DMSO, a następnie rozcieńczono medium hodowlanym, tak aby końcowe stężenie DMSO nie przekroczyło 0,2 %. Komórki (nietraktowane) w medium hodowlanym przyjęto jako kontrole. Po 72 lub 96 godzinach inkubacji z badanymi związkami przeprowadzono test MTS, polegający na dodaniu 20 µL barwnika (TheCellTiter 96® AQueous One Solution – MTS) do dołków zawierających 100 µL medium bez czerwieni, następnie płytkę umieszczano na godzinę w 37 °C. Po tym czasie zmierzono absorbancję powstałego formazanu przy długości fali 490 nm, za pomocą czytnika płytek wielodołkowych Synergy4. Procent żywych komórek wyliczano porównując wartość absorbancji prób badanych z wartością absorbancji kontroli (komórki nietraktowane związkami). Absorbancje kontroli przyjmowano za 100%. Uzyskane wyniki z 4-5 niezależnych eksperymentów, w 3 powtórzeniach każdy, przedstawiono w formie wartości IC₅₀ (stężenie związku, które redukowało odsetek żywych komórek o 50%) wyliczonych przy pomocy programu GraphPad Prism 5.

Tabela 20. Warunki hodowli komórek w zależności od linii komórkowej i czasu inkubacji

Linia komórkowa	Ilość komórek	Czas inkubacji
HCT116, MCF-7, U-251, Hs 683	5 000 komórek/dołek	72 godziny
NHDF	4 000 komórek/dołek	72 godziny
HCT116, MCF-7	3 500 komórek/dołek	96 godzin
NHDF	3 000 komórek/dołek	96 godzin

6. Badanie mechanizmu działania wybranych pochodnych tiosemikarbazonu

6.1 Ocena cytotoksyczności badanych pochodnych w obecności jonów metali

Komórki linii HCT116 oraz MCF-7 wysiano na 96-dołkowe płytki w ilości 3 500 komórek/dołek, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37 °C, 5 % CO₂. Po tym czasie, wzrastające stężenia badanych związków wraz z roztworami 20 µM CuSO₄, FeSO₄ lub FeCl₃ podano na płytki, a komórki poddano 96 - godzinnej inkubacji. Roztwory wyjściowe przygotowano w DMSO, a następnie rozcieńczono medium hodowlanym, tak aby stężenie DMSO nie przekroczyło 0,2 %. Komórki (nietraktowane) oraz komórki zawierające roztwory 20 µM CuSO₄, FeSO₄ lub FeCl₃ przyjęto jako kontrole. Po 96 godzinach inkubacji z badanymi związkami przeprowadzono test MTS. Procent żywych komórek wyliczano porównując wartość absorbancji prób badanych z wartością absorbancji kontroli (komórki nietraktowane związkami). Uzyskane wyniki z 3-4 niezależnych eksperymentów, w 3 powtórzeniach każdy, przedstawiono w formie wartości IC₅₀ wyliczonych przy pomocy programu GraphPad Prism 5.

6.2 Wpływ TSC na generowanie reaktywnych form tlenu

6.2.1 Zdjęcia mikroskopowe

Komórki linii HCT116 p53^{+/+} wysiano na płytki 8-dołkowe (Lab-Tek) przeznaczone do hodowli preparatów mikroskopowych w ilości 50 000 komórek/dołek, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37 °C. Po tym czasie, dodano świeżo przygotowane roztwory pochodnych TSC w stężeniach odpowiadających 2-krotnej wartości IC₅₀, a komórki poddano 24 - godzinnej inkubacji. Roztwory przygotowano w sposób analogiczny jak w teście MTS (rozdział 5). Komórki nietraktowane stanowiły kontrole. Dodatkowo jako kontrolę pozytywną przyjęto komórki traktowane 100 µM roztworem H₂O₂ (inkubowane 15 minut). Po 24 godzinach dołki

przepłukano buforem PBS, a następnie dodano do nich 5 μM roztworu odczynnika CellROX[®] Green Reagent ($\lambda_{\text{ex}}=485\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=520\text{ nm}$) i inkubowano 30 minut w temperaturze 37 °C. Po tym czasie komórki przepłukano PBS i dodano medium bez czerwieni fenolowej. Obserwacje prowadzono pod odwróconym mikroskopem fluorescencyjnym Olympus IX81 wyposażonym w komorę inkubacyjną, w świetle przechodzącym oraz po wzbudzeniu filtrem FITC przepuszczającym promieniowanie 520 nm.

6.2.2 Określenie poziomu generowania reaktywnych form tlenu w zależności od czasu

Komórki linii HCT116 p53^{+/+} oraz MCF-7 wysiano na 96-dołkowe płytki w ilości 9 000 komórek/dołek, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37 °C. Po tym czasie, dodano świeżo przygotowane roztwory pochodnych tiosemikarbazonu o stężeniu 1 μM oraz doksorubicynę w stężeniu 5 μM , a komórki poddano 3, 6, 9, 12 i 24 - godzinnej inkubacji w kinetycznym eksperymencie. Roztwory przygotowano w sposób analogiczny jak w teście MTS. Komórki nietraktowane stanowiły kontrole. Dodatkowo jako kontrolę pozytywną przyjęto komórki traktowane 100 μM roztworem H₂O₂ (inkubowane 15 minut). Po odpowiednim czasie inkubacji, usuwano medium, następnie do każdego dołka dodano po 5 μM roztworów CellROX[®] Green Reagent oraz Hoechst 33342 i inkubowano 30 minut w temperaturze 37 °C. Po tym czasie, pomiar fluorescencji prowadzono przy odpowiednich długościach fali wzbudzenia i emisji (CellROX[®] Green Reagent - $\lambda_{\text{ex}}=485\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=520\text{ nm}$; Hoechst 33342 - $\lambda_{\text{ex}}=345\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=485\text{ nm}$) za pomocą czytnika płytek wielodołkowych Synergy4. Ilość komórek w poszczególnych dołkach oznaczono za pomocą barwnika Hoechst 33342, po czym uzyskane wyniki znormalizowano do komórek nietraktowanych. Następnie, procent poziomu reaktywnych form tlenu wyliczano porównując wartość fluorescencji prób badanych do próby kontrolnej. Wartość fluorescencji kontroli przyjmowano za 100%. Uzyskane wyniki pochodzą z 3-4 niezależnych eksperymentów.

6.3 Wpływ TSC na poziom wewnątrzkomórkowego glutationu w zależności od czasu

Komórki linii HCT116 p53^{+/+} wysiano na szalki o średnicy 3 cm (Nunc) w ilości 500 000 komórek/dołek, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37 °C. Po tym czasie, dodano świeżo przygotowane roztwory pochodnych tiosemikarbazonu o stężeniu 1 μM oraz

doksorubicynę w stężeniu 5 μ M, a komórki poddano 3, 6, 9, 12 i 24 - godzinnej inkubacji w kinetycznym eksperymencie. Roztwory przygotowano w sposób analogiczny jak w teście MTS. Komórki nietraktowane stanowiły kontrole. Poziom wewnątrzkomórkowego glutationu określono metodą opisaną przez Rahman i in., 2006 [312]. Po odpowiednim czasie inkubacji, komórki przemywano dwukrotnie buforem PBS, następnie trypsynizowano 0,05 % roztworem Trypsyna-EDTA. Następnie zawiesinę komórek zwirowano przy 1 000 x g przez 5 minut i 4 °C, usunięto supernatant i komórki zawieszono w roztworze lizującym (0,1% Triton-X i 0,6% kwas sulfosalicylowego w buforze fosforanowym). Kolejno, zawiesinę komórek sonikowano na lodzie przez 2-3 minuty, po czym dwukrotnie zamrażano w ciekłym azocie (-195,8 °C) i rozmrażano na lodzie, na koniec zwirowano przy 3 000 x g przez 4 minuty w 4°C. W ten sposób przygotowane lizaty w ilości 20 μ L przenoszono na 96-dołkowe płytki. Następnie, świeżo przygotowane roztwory DNTB (0,67 mg/mL) oraz reduktazy glutationu (1,67 units/mL) dodano do każdego dołka i inkubowano przez 30 sekund. Po tym czasie, dodano β -NADPH (0,67 mg/mL) do każdego dołka, wymieszano i po chwili zmierzono absorbancję przy długości fali 412 nm, za pomocą czytnika płytek wielodołkowych Synergy4. Następnie, procent poziomu wewnątrzkomórkowego glutationu wyliczano porównując wartość absorbancji prób badanych z wartością absorbancji kontroli. Wartość absorbancji kontroli przyjmowano za 100 %. Uzyskane wyniki pochodzą z 3-4 niezależnych eksperymentów.

6.4 Wpływ TSC na ekspresję genów związanych ze stresem oksydacyjnym

6.4.1 Projektowanie starterów do reakcji PCR

Do projektowania starterów wykorzystano sekwencje mRNA badanych genów, opublikowanych w bazie NCBI. Sekwencje starterów wykorzystanych w reakcji PCR w czasie rzeczywistym zaprojektowano przy użyciu programu Primer 3. Sekwencje starterów dodatkowo zweryfikowano w programie Oligo 6.0. Syntezę starterów oraz ich oczyszczanie metodą HPLC zlecono firmie Sigma-Aldrich.

Tabela 21. Sekwencje zaprojektowanych starterów użytych do określenia ekspresji mRNA MnSOD, CAT, Ndr1, β -aktyny

Gen	Numer sekwencji w bazie GenBank	Starter Forward (5'→3')	Starter Reverse (5'→3')
MnSOD	NM_001024465.1	AAACCTCAGCCCTAACGGTG	CCAGGCTTGATGCACATCTTA
CAT	NM_001752.3	ACTGTTGCTGGAGAATCGGG	AAGTCTCGCCGCATCTTCAA
Ndr1	NM_006096.3	GTCTCGGGAGATGCAGGATG	TGTGGTTCATGCCGATGTCA
β -aktyna	NM_001101.3	CTCGCCTTTGCCGATCC	GCTGGGGTGTGAAGGTCTC

6.4.2 Izolacja całkowitego RNA

Komórki linii HCT116 p53^{+/+} wysiano na szalki o średnicy 3 cm (Nunc) w ilości 500 000 komórek/dołek, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37 °C. Po tym czasie, dodano świeżo przygotowane roztwory pochodnych tiosemikarbazonu o stężeniu 1 μ M oraz doksorubicynę w stężeniu 5 μ M, a komórki poddano 12 i 24 - godzinnej inkubacji. Roztwory przygotowano w sposób analogiczny jak w teście MTS (rozdział 5). Komórki nietraktowane stanowiły kontrole. Po odpowiednim czasie inkubacji, wyizolowano całkowite komórkowe RNA za pomocą odczynnika TRIzol Reagent, będącego mieszaniną fenolu i izotiocyanianu guanidyny. W tym celu usunięto medium, a następnie rozpoczęto lizę komórek poprzez dodanie 1 mL odczynnika TRIzol Reagent (5 minut w temperaturze pokojowej). Całość przeniesiono do mikroprobówki, po czym do lizatów dodano po 0,2 mL chloroformu, inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, a następnie zwirowano przy 12 000 x g przez 15 minut w 4 °C. Następnie zebrano górną warstwę wodną zawierającą RNA, dodano 0,5 mL alkoholu izopropylowego w celu precypitacji RNA (10 minut w temperaturze pokojowej) i zwirowano przy 12 000 x g przez 10 minut w 4 °C. Uzyskane RNA przepłukano 1 mL 75 % alkoholu etylowego i zwirowano przy 7 500 x g przez 5 minut. Następnie usunięto supernatant, a peletkę suszono na powietrzu przez maksymalnie 10 minut, po czym RNA rozpuszczono w 50 μ L ddH₂O-DEPC. W celu sprawdzenia ilości i jakości wyizolowanego RNA wykonano pomiary spektrofotometryczne przy pomocy NanoDrop 2000.

6.4.3 Odwrotna transkrypcja

Do syntezy cDNA na matrycy całkowitego RNA wykorzystano komercyjny zestaw GoScript™ Reverse Transcriptase kit. Mieszaninę reakcyjną (I) dla pojedynczej próby przygotowano poprzez dodanie 5 µg wyizolowanego całkowitego RNA, 0,5 µL startera oligo(dT)₂₃ o stężeniu 3,5 µM, a następnie dopełniono ddH₂O-DEPC do 5 µL. Mieszaninę poddano 5 minutowej inkubacji w temperaturze 70 °C, po czym natychmiast schłodzono na lodzie przez 5 minut, na koniec próbki zwirowano przez 10 sekund. Następnie przygotowano mieszaninę reakcyjną (II) poprzez dodanie 4 µL buforu reakcyjnego GoScript™ (5x stężony), 1 µL mieszaniny deoksynuleotydów dNTP (10mM), 2,4 µL MgCl₂ (25 mM), 1 µL odwrotnej transkryptazy GoScript™, a następnie dopełniono ddH₂O-DEPC do 15 µL. Obie mieszaniny połączono, tworząc mieszaninę reakcyjną o końcowej objętości 20 µL. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono za pomocą termocyklera C1000 Touch™ w następujących warunkach: 25 °C przez 5 minut, 42 °C przez 60 minut, 70 °C przez 15 minut, na koniec mieszaninę schłodzono na lodzie. Uzyskany w ten sposób cDNA wykorzystano w łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym.

6.4.4 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzano na płytkach 96-dołkowych w aparacie CTX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System. W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 10 µL na pojedynczą reakcję wchodził 1 µL uzyskanej matrycy (cDNA), 5 µL zestawu PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (2x stężony), po 0,5 µL starterów forward i reverse (20 µM każdy) oraz 3 µL ddH₂O. Reakcję PCR prowadzono w następujących warunkach: początkowa denaturacja - 95 °C przez 120 sekund, a następnie powtórzono w 40 cyklach: denaturacja - 95 °C przez 15 sekund; przyłączanie starterów 60 °C - 30 sekund; wydłużanie - 72 °C - 60 sekund. Następnie dokonywano oceny temperatury topnienia otrzymanych produktów z dokładnością do 0,1 °C/s. Każdą próbkę cDNA amplifikowano w trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki analizowano w odniesieniu do genu referencyjnego (β-aktyna) amplifikowanego z tego samego cDNA, na podstawie metody $2^{-\Delta\Delta CT}$ opisanej przez Livak i Schmittgen, 2001 [371]. Analizę ekspresji genów przeprowadzono w oprogramowaniu Bio-Rad CFX Manager 3.1. Wyniki pochodzą z co najmniej 3 niezależnych eksperymentów.

6.5 Wpływ TSC na regulację cyklu komórkowego

Komórki linii HCT116 p53^{+/+}, MCF-7, U-251 wysiano na szalki o średnicy 3 cm (Nunc) w ilości 250 000/szalkę, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37 °C. Po tym czasie, dodano świeżo przygotowane roztwory pochodnych tiosemikarbazonu o stężeniu 1 μ M oraz doksorubicynę w stężeniu 5 μ M. Roztwory przygotowano w sposób analogiczny jak w teście MTS (rozdział 5). Komórki nietraktowane stanowiły kontrole. Po 48 godzinach inkubacji, komórki przepłukano PBS, trypsynizowano 0,05 % roztworem Trypsyna-EDTA, a następnie zawieszono w medium i zwirowano przy 300 g przez 5 minut. Po usunięciu supernatantu, komórki zawieszono w PBS i ponownie zwirowano w tych samych warunkach. Otrzymaną peletkę zawieszono w 50 μ L PBS, po czym utrwalono w 1 mL 70 % lodowatego etanolu przez noc w -20 °C. Po tym czasie, próbki zwirowano przy 300 g przez 5 minut, następnie zawieszono w 250 μ L PBS i ponownie zwirowano w tych samych warunkach. Otrzymaną peletkę komórek zawieszono w 200 μ L odczynnika Muse™ Cell Cycle Reagent, zawierającego jodek propidyny, po czym inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w warunkach zredukowanego natężenia światła. Po tym czasie, próbki analizowano w mikrokapilarnym cytometrze przepływowym Muse Cell Analyzer. Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnią odsetka komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego dla danej próbki. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń eksperymentu.

6.6 Ocena wpływu TSC na indukcję apoptozy

Komórki linii HCT116 p53^{+/+}, MCF-7, U-251 wysiano na szalki o średnicy 3 cm (Nunc) w ilości 250 000/szalkę, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37 °C. Po tym czasie, dodano świeżo przygotowane roztwory pochodnych tiosemikarbazonu o stężeniu 1 μ M oraz doksorubicynę w stężeniu 5 μ M. Roztwory przygotowano w sposób analogiczny jak w teście MTS. Komórki nietraktowane stanowiły kontrole. Po 48 godzinach inkubacji, komórki przepłukano PBS, trypsynizowano 0,05 % roztworem Trypsyna-EDTA, a następnie zawieszono w medium i zwirowano przy 500 x g przez 5 minut. Po usunięciu supernatantu, komórki zawieszono w PBS i ponownie zwirowano w tych samych warunkach. Otrzymaną peletkę komórek zawieszono w 100 μ L odczynnika Muse™ Annexin V & Dead Cell Reagent, po czym inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej w warunkach zredukowanego natężenia światła. Po barwieniu, próbki analizowano w mikrokapilarnym cytometrze przepływowym Muse Cell Analyzer. Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnią odsetka

komórek żywych, wczesno- oraz późno- apoptotycznych dla danej próbki. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń eksperymentu.

6.7 Wpływ TSC na ekspresję białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego oraz indukcję apoptozy

6.7.1 Izolacja białek

Komórki linii HCT116 p53^{+/+} wysiano na szalki o średnicy 3 cm (Nunc) w ilości 500 000 komórek/dołek, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37 °C. Po tym czasie, dodano świeżo przygotowane roztwory pochodnych tiosemikarbazonu o stężeniu 1 µM oraz doksorubicynę w stężeniu 5 µM, a komórki poddano 24 i 48 - godzinnej inkubacji. Roztwory przygotowano w sposób analogiczny jak w teście MTS. Komórki nietraktowane stanowiły kontrole. Po odpowiednim czasie inkubacji, komórki przepłukano PBS, a następnie trypsynizowano 0,05 % roztworem Trypsyna-EDTA, po czym zawieszono w zimnym PBS i zwirowano przy 2 000 rpm przez 5 minut w 4 °C. Następnie usunięto supernatant, a komórki zawieszono w 150 µL buforu lizującego RIPA z dodatkiem koktajli inhibitorów proteaz i fosfataz wraz z 0,5 M EDTA. Próbkę inkubowano przez 20 minut na lodzie, po czym lizaty sonikowano i wirowano przy 10 000 rpm przez 10 minut w 4 °C, celem osadzenia resztek komórek nie ulegających lizie w buforze RIPA. Uzyskany lizat białkowy zamrożono w -80 °C do dalszych analiz, uprzednio używając 5 µL lizatu do pomiaru stężenia białka.

6.7.2 Pomiar stężenia białka

Stężenie białka w otrzymanych lizatach oznaczono komercyjnym zestawem - BCA Protein Assay Kit zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. W tym celu przygotowano krzywą wzorcową używając jako standardu - surowiczej albuminy wołowej (BSA) o stężeniu wyjściowym 2 mg/mL. Następnie po 20 µL próby badanej (rozcieńczenie 1:4) lub standardu przenoszono na płytkę 96-dołkową, w trzech powtórzeniach. Po tych czynnościach, przygotowano na świeżo roztwór „WR” (ang. *working reagent*), poprzez zmieszanie odczynników „A” i „B” w stosunku 50:1, a następnie dodano po 150 µL do każdego dołka. Po 30 minutach inkubacji w 37 °C, przeprowadzono pomiar absorbancji przy długości fali 562 nm, za pomocą czytnika płytek wielodołkowych Synergy4. Zawartość białka obliczano na

podstawie krzywej wzorcowej, wykreślonej na podstawie wartości absorbancji roztworów BSA o stężeniach $0,2 \div 1,2$ mg/mL.

6.7.3 Elektroforeza SDS-Page

W pierwszym etapie przeprowadzono rozdział elektroforetyczny zdenaturowanych białek względem ich masy cząsteczkowej. W tym celu, przygotowano równe ilości białek (20 µg) z lizatów komórkowych, razem z buforem obciążającym - NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) oraz środkiem redukującym (500 mM DTT). Przygotowane próbki inkubowano przez 10 minut w temperaturze 70 °C, po czym zwirowano i umieszczono na lodzie. Następnie próbki oraz marker wielkości (Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard) nałożono na 4-12 % żel gradientowy - poliakrylamidowy (skład podano w Tabeli 22-23). Elektroforezę SDS-Page prowadzono w aparacie Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad) w buforze Tris-Glycine-SDS Buffer (1x) schłodzonym do temperatury 4 °C. Rozdział prowadzono przy stałym napięciu - 125 V przez około 1,5 godziny.

Tabela 22. Skład 4 % zagęszczającego żelu poliakrylamidowego

Odczynnik	Stężenie końcowe
30 % Akrylamid/bis-akrylamid	4 %
1M Tris-HCl; pH 6,8	125 mM
10 % SDS	0,1 %
10 % APS	0,05 %
TEMED	0,1 %

Tabela 23. Skład 12% rozdzielającego żelu poliakrylamidowego

Odczynnik	Stężenie końcowe
30 % Akrylamid/bis-akrylamid	12 %
1M Tris-HCl; pH 8,8	375 mM
10 % SDS	0,1 %
10 % APS	0,05 %
TEMED	0,1 %

6.7.4 Transfer białek na membranę i immunodetekcja

Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym, białka transferowano na nitrocelulozową membranę o wielkości porów 0,2 μm . Elektrotransfer prowadzono w aparacie Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad) w buforze do transferu (1x), zawierającym metanol przez 2,5 h przy stałym natężeniu 330 mA. Po zakończonym elektrotransferze, membranę nitrocelulozową blokowano w roztworze 5 % odtłuszczonego mleka w PBS, zawierającym 0,1 % Tween-20 (TPBS) przez 1 godzinę. Po blokowaniu, membrany inkubowano ze specyficznymi przeciwciałami I-rzędowymi w 5 % odtłuszczonym mleku w TPBS (Tabela 24.) przez noc na wytrząsarce w 4 °C. Po tym czasie, membrany płukano trzykrotnie po 5 minut w TPBS, a następnie inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami II-rzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (HRP) (Tabela 24.) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, membrany ponownie płukano trzykrotnie po 5 minut w TPBS, a następnie inkubowano przez 5 minut w odczynniku pozwalającym na detekcję białek - SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate. Chemiluminescencyjny sygnał przechwytywano za pomocą transiluminatora ChemiDoc™ XRS+ System (BioRad). Eksperyment powtórzono co najmniej 3-krotnie.

Tabela 24. Przeciwciała użyte do detekcji białek techniką Western blot

Przeciwciało	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Masa białka
cdc2 (POH1) - I-rzędowe	mysie monoklonalne IgG2a	1:1000	34 kDa
p21 ^{Waf1/Cip1} (12D1) - I-rzędowe	królicze monoklonalne IgG	1:1000	21 kDa
p53 (1C12) - I-rzędowe	mysie monoklonalne IgG1	1:1000	53 kDa
β -aktyna (8H10D10) - I-rzędowe	mysie monoklonalne IgG2b	1:1000	45 kDa
II-rzędowe	końskie anty-mysie IgG- HRP	1:1000	-
II-rzędowe	kozy anty-królicze IgG- HRP	1:1000	-

6.7.5 Analiza densytometryczna

Analizę densytometryczną z każdego z co najmniej 3 niezależnych eksperymentów przeprowadzono w oprogramowaniu ImageJ 1.41 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Poziom ekspresji białek dla prób badanych normalizowano do kontroli,

a następnie całość względem ekspresji białka referencyjnego - β -aktyny. Otrzymane wyniki wyrażono jako średnią arytmetyczną z odchyleniem standardowym.

6.8 Interkalacja z DNA

Liofilizowane DNA z grasicy cielęcej (CT-DNA) rozpuszczono w 10 mM roztworze Tris-HCl o pH 7,9, po czym delikatnie wymieszano i pozostawiono na noc w 4 °C. Po tym czasie, stężenie roztworu CT-DNA zmierzono metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem znanych wartości ekstynkcji molowej DNA ($6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) oraz prawa Lamberta-Beera. Ponadto zmierzono stosunek absorpcji przy długościach fali 260 i 280 nm, celem określenia czystości CT-DNA. Następnie bezpośrednio przed eksperymentem, przygotowano dwie serie roztworów pochodnych tiosemikarbazonu i doksorubicyny o stężeniach: 25 μM ; 12,5 μM ; 6 μM i 3 μM w 10 mM Tris-HCl (pH 7,9). Do jednej serii wcześniej przygotowanych roztworów dodano 18 μM CT-DNA, po czym całość inkubowano przez 1,5 godziny w 37 °C, okazjonalnie mieszając. Widma absorpcyjne zarejestrowano przy pomocy spektrofotometru U-2900 wyposażonego w lampę deuterową oraz wolframową o zakresie spektralnym 190 – 1100 nm i monochromator z siatką dyfrakcyjną o wysokiej rozdzielczości. Szybkość skanowania wynosiła 1200 nm/min, krok 2 nm, szerokość szczeliny 1,50 nm, zakres spektralny 200 – 650 nm. Interpretacja otrzymanych wyników została przygotowana przy użyciu oprogramowania UV-Solution oraz OriginPro 8.0.

7. Synergia farmakologiczna

7.1 Synergistyczne działanie TSC z fotouczulaczami

Komórki linii HCT116 p53^{+/+} wysiano na szalki o średnicy 3 cm (Nunc) w ilości 200 000/szalkę, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37 °C. Po tym czasie, dodano przygotowane roztwory pochodnych tiosemikarbazonu oraz fotouczulaczy, a komórki inkubowano kolejne 24 godziny. Po tym czasie medium usunięto, komórki przepłukano PBS, a następnie dodano 1 mL DMEM bez surowicy i czerwieni fenolowej. Kolejno, komórki naświetlono światłem czerwonym - 660 nm w dawce 12 J/cm². A następnie medium bez surowicy i czerwieni fenolowej zastąpiono standardowym medium hodowlanym z surowicą. Po 24 h inkubacji frakcja przeżywająca komórek została określona przy pomocy testu MTS

opisanego w rozdziale 5. Roztwory zostały przygotowane bezpośrednio przed eksperymentem, a pomiary prowadzono w warunkach zredukowanego natężenia światła. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń w 3 niezależnych eksperymentach. Rodzaj oraz siłę oddziaływania (synergia, antagonizm) określono przy użyciu oprogramowania CompuSyn.

7.2 Lokalizacja wewnątrzkomórkowa TSC i fotouczulaczy

Komórki linii HCT116 p53^{+/+} wysiano na szkiełka podstawowe w ilości 300 000/szalkę, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37 °C. Po tym czasie, dodano świeżo przygotowane roztwory pochodnych tiosemikarbazonu: Dp44mT (15 nM), MS168 (15 nM), 3-AP (1,67 μM) oraz fotouczulaczy – chloryny c i Foscanu (2,5 μM), a komórki inkubowano kolejne 24 godziny. Po tym czasie medium usunięto, komórki przepłukano PBS, a następnie dodano roztwór odpowiedniego barwnika wiążącego się z mitochondriami: MitoTracker® Orange (100 nM) lub MitoTracker® Green (100 nM) i inkubowano 30 minut w 37 °C. Po barwieniu, komórki przepłukano PBS i utrwalono przez 10 minut w 3,7 % roztworze paraformaldehydu. Wewnątrzkomórkową lokalizację związków obserwowano przy pomocy systemu konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej Olympus Fluoview FV1000. Fluorescencję tiosemikarbazonów wzbudzano laserem diodowym o długości fali 405 nm i odczytywano przy długości 461 nm. Fluorescencję barwnika MitoTracker Green wzbudzano laserem argonowo-jonowym o długości fali 488 nm i odczytywano przy długości fali 519 nm. Z kolei fluorescencję fotouczulaczy oraz barwnika MitoTracker Orange wzbudzano laserem helowo-neonowym o długości fali 543 nm i odczytywano przy długości fali 615 nm (dla fotouczulaczy) oraz 576 nm (dla trackera). Obrazy uzyskano stosując obiektyw immersyjny 60x Plan Apo 60x (NA 1,35). Analizę przeprowadzono przy pomocy oprogramowania ImageJ 1.41 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

7.3 Wpływ TSC i fotouczulaczy na ekspresję genów związanych z obroną antyoksydacyjną

7.3.1 Projektowanie starterów do reakcji PCR

Do projektowania starterów wykorzystano sekwencje mRNA badanych genów, opublikowanych w bazie NCBI. Sekwencje starterów wykorzystanych w reakcji PCR w czasie

rzeczywistym zaprojektowano przy użyciu programu Primer 3. Sekwencje starterów dodatkowo zweryfikowano w programie Oligo 6.0. Syntezę starterów oraz ich oczyszczanie metodą HPLC zlecono firmie Sigma-Aldrich.

Tabela 25. Sekwencje zaprojektowanych starterów użytych do określenia ekspresji mRNA MnSOD, CAT, GADPH

Gen	Numer sekwencji w bazie GenBank	Starter Forward (5'→3')	Starter Reverse (5'→3')
MnSOD	NM_001024465.1	AAACCTCAGCCCTAACGGTG	CCAGGCTTGATGCACATCTTA
CAT	NM_001752.3	ACTGTTGCTGGAGAATCGGG	AAGTCTCGCCGCATCTTCAA
GADPH	NM_002046	GAGTCAACGGATTTGGTCGTA	GCCCCACTTGATTTTGGAG

7.3.2 Izolacja całkowitego RNA

Komórki linii HCT116 p53^{+/+} wysiano na szalki o średnicy 3 cm (Nunc) w ilości 500 000 komórek/dolek, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37 °C. Po tym czasie, dodano świeżo przygotowane roztwory pochodnych tiosemikarbazonu: Dp44mT i MS168 o stężeniu 25 nM oraz fotouczulaczy: chloryny i Foscanu o stężeniu 0,5 µM. Ponadto, celem wygaszenia reaktywnych form tlenu dodano Neokuproinę w stężeniu 25 µM. Komórki nietraktowane stanowiły kontrole. Roztwory zostały przygotowane bezpośrednio przed eksperymentem, a wszystkie czynności prowadzono w warunkach zredukowanego natężenia światła. Po 24 godzinnej inkubacji, komórki naświetlono światłem czerwonym - 660 nm w dawce 12 J/cm², a następnie inkubowano przez 6 godzin w 37 °C. Po tym czasie inkubacji, wyizolowano całkowite komórkowe RNA za pomocą odczynnika TRIzol Reagent. Całą procedurę opisano powyżej w podrozdziale 6.4.2.

7.3.3 Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną powyżej w podrozdziale 6.4.3.

7.3.4 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzano na płytkach 96-dołkowych w aparacie CTX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System. W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 20 μL na pojedynczą reakcję wchodził 1 μL uzyskanej matrycy (cDNA), 10 μL zestawu SYBR® Green PCR Master Mix (2x stężony), po 0,5 μL starterów forward i reverse (20 μM każdy) oraz 7 μL ddH₂O. Reakcję PCR prowadzono w następujących warunkach: początkowa denaturacja - 95 °C przez 20 sekund, a następnie powtórzono w 40 cyklach: denaturacja - 95 °C przez 10 sekund; przyłączanie starterów 60 °C - 20 sekund; wydłużanie - 72 °C - 30 sekund. Następnie dokonywano oceny temperatury topnienia otrzymanych produktów z dokładnością do 0,1 °C/s. Każdą próbkę cDNA amplifikowano w trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki analizowano w odniesieniu do genu referencyjnego (GADPH) amplifikowanego z tego samego cDNA, na podstawie metody $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ opisaną przez Livak i Schmittgen, 2001 [371]. Analizę ekspresji genów przeprowadzono w oprogramowaniu Bio-Rad CFX Manager 3.1. Wyniki pochodzą z co najmniej 3 niezależnych eksperymentów.

7.4 Wpływ TSC i fotouczulaczy na peroksydację lipidów

Komórki linii HCT116 p53^{+/+} wysiano na szalki o średnicy 3 cm (Nunc) w ilości 300 000/szalkę, a następnie inkubowano przez 24 godziny w 37 °C. Po tym czasie, dodano świeżo przygotowane roztwory pochodnych tiosemikarbazonu oraz fotouczulaczy w stężeniach 0,05 μM , 0,75 μM , 1,5 μM , 3 μM , 10 μM , a komórki inkubowano kolejne 24 godziny. Po tym czasie medium usunięto, komórki przepłukano PBS, a następnie dodano 1 mL DMEM bez surowicy i czerwieni fenolowej. Kolejno, komórki naświetlono światłem czerwonym - 660 nm w dawce 12 J/cm². A następnie medium bez surowicy i czerwieni fenolowej zastąpiono standardowym medium hodowlanym z surowicą i inkubowano w 37 °C. Po 3 godzinach, komórki przepłukano PBS, następnie trypsynizowano 0,05 % roztworem Trypsyna-EDTA. Następnie zawiesinę komórek zwirowano przy 14 000 rpm przez 2 minuty, usunięto supernatant i komórki zawieszono w PBS. Następnie przygotowane roztwory 15 % kwasu trójchlorooctowego w 0,25 M HCl oraz 0,37 % kwasu tiobarbiturowego w 0,25 M HCl dodano do każdej próbki i inkubowano w 90 °C przez 20 minut. Po tym czasie, próbki natychmiast schłodzono na lodzie przez 5 minut, a następnie zwirowano przy 5 000 rpm przez 5 minut. Po tym czasie zmierzono absorbancję powstałego produktu - malondialdehydu przy długości fali 532 nm, za pomocą czytnika płytek wielodołkowych Synergy4. Stężenie powstałego malondialdehydu obliczono

przy pomocy molowego współczynnika absorpcji, który wynosi $156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, na podstawie prawa Lamberta-Beera. Uzyskane wyniki pochodzą z 3-4 niezależnych eksperymentów.

8. Analiza statystyczna

Wszystkie wyniki wyrażono jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe (SD) z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA), stosując testy t-Studenta oraz ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego. Poziom istotności (p-value) $< 0,05$ uznano za znamienne statystycznie. Współczynnik kombinacji CI wraz z wartościami błędów obliczono w oprogramowaniu CompuSyn.

VI. LITERATURA

- [1] Worldwide cancer statistics Cancer Research UK,
<http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer>
- [2] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Cancer*. 136 (2015) E359–E386.
- [3] S. Chakraborty, T. Rahman, The difficulties in cancer treatment, *Ecancermedicalscience*. 6 (2012) ed16. doi:10.3332/ecancer.2012.ed16.
- [4] A. Levitzki, S. Klein, Signal transduction therapy of cancer, *Mol. Aspects Med.* 31 (2010) 287–329.
- [5] K. Imai, A. Takaoka, Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer, *Nat. Rev. Cancer*. 6 (2006) 714–727.
- [6] T.A. Baudino, Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment., *Curr. Drug Discov. Technol.* 12 (2015) 3–20.
- [7] G.P. Adams, L.M. Weiner, Monoclonal antibody therapy of cancer, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 1147–1157.
- [8] L.M. Weiner, R. Surana, S. Wang, Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 317–327.
- [9] P.B. Chapman, A. Hauschild, C. Robert, J.B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, et al., Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation, *N. Engl. J. Med.* 364 (2011) 2507–2516.
- [10] M.D. Siegelin, A.C. Borczuk, Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma, *Lab. Investig.* 94 (2014) 129–137.
- [11] N. Iqbal, N. Iqbal, Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer, *Chemother Res Pr.* 2014 (2014) 357027.
- [12] P. Sharma, S. Hu-Lieskovan, J.A. Wargo, A. Ribas, Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy, *Cell*. 168 (2017) 707–723.

- [13] F.H. Groenendijk, R. Bernards, Drug resistance to targeted therapies: Déjà vu all over again, *Mol. Oncol.* 8 (2014) 1067–1083.
- [14] J.S. Logue, D.K. Morrison, Complexity in the signaling network: Insights from the use of targeted inhibitors in cancer therapy, *Genes Dev.* 26 (2012) 641–650.
- [15] S. Chandarlapaty, Negative feedback and adaptive resistance to the targeted therapy of cancer, *Cancer Discov.* 2 (2012) 311–319.
- [16] S. Giordano, A. Petrelli, From Single- to Multi-Target Drugs in Cancer Therapy: When Aspecificity Becomes an Advantage, *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) 422–432.
- [17] A.S. Reddy, S. Zhang, Polypharmacology: drug discovery for the future, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 6 (2013) 41–47.
- [18] Y. Yamanishi, M. Araki, A. Gutteridge, W. Honda, M. Kanehisa, Prediction of drug-target interaction networks from the integration of chemical and genomic spaces, *Bioinformatics.* 24 (2008) i232–i240.
- [19] J. Tang, T. Aittokallio, Network Pharmacology Strategies Toward Multi-Target Anticancer Therapies: From Computational Models to Experimental Design Principles, *Curr. Pharm. Des.* 20 (2014) 23–36.
- [20] G. Bottegoni, A.D. Favia, M. Recanatini, A. Cavalli, The role of fragment-based and computational methods in polypharmacology, *Drug Discov. Today.* 17 (2012) 23–34.
- [21] A. Anighoro, J. Bajorath, G. Rastelli, Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discovery, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 7874–7887.
- [22] R. Morphy, C. Kay, Z. Rankovic, From magic bullets to designed multiple ligands, *Drug Discov. Today.* 9 (2004) 641–651.
- [23] L. Costantino, D. Barlocco, Privileged Structures as Leads in Medicinal Chemistry, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 65–85.
- [24] C.D. Duarte, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, Privileged Structures: A Useful Concept for the Rational Design of New Lead Drug Candidates, *Med. Chem.* 7 (2007) 1108–1119.
- [25] R.W. DeSimone, K.S. Currie, S.A. Mitchell, J.W. Darrow, D.A. Pippin, Privileged structures: applications in drug discovery., *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 7

(2004) 473–94.

- [26] A.A. Patchett, R.P. Nargund, Chapter 26. Privileged structures — An update, in: *Annu. Rep. Med. Chem.*, 2000: pp. 289–298.
- [27] M.E. Welsch, S.A. Snyder, B.R. Stockwell, Privileged scaffolds for library design and drug discovery, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 347–361.
- [28] K.A. Jacobson, Y.C. Kim, B.F. King, In search of selective P2 receptor ligands: Interaction of dihydropyridine derivatives at recombinant rat P2X2 receptors, *J. Auton. Nerv. Syst.* 81 (2000) 152–157.
- [29] S. Prachayasittikul, R. Pingaew, A. Worachartcheewan, N. Sinthupoom, V. Prachayasittikul, S. Ruchirawat, V. Prachayasittikul, Roles of pyridine and pyrimidine derivatives as privileged scaffolds in anticancer agents, *Mini-Reviews Med. Chem.* 17 (2017) 869–901.
- [30] J. Kim, H. Kim, S.B. Park, Privileged structures: Efficient chemical “navigators” toward unexplored biologically relevant chemical spaces, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 14629–14638.
- [31] K. Briner, I. Collado, M.J. Fisher, C. García-Paredes, S. Husain, S.L. Kuklish, A.I. Mateo, T.P. O'Brien, P.L. Ornstein, J. Zgombick, O. de Frutos, Privileged structure based ligands for melanocortin-4 receptors-Aliphatic piperazine derivatives, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 3449–3453.
- [32] D.A. Horton, G.T. Bourne, M.L. Smythe, Exploring privileged structures: The combinatorial synthesis of cyclic peptides, *Mol. Divers.* 5 (2000) 289–304.
- [33] V. R. Solomon, H. Lee, Quinoline as a Privileged Scaffold in Cancer Drug Discovery, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 1488–1508.
- [34] R. Musiol, An overview of quinoline as a privileged scaffold in cancer drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.* 12 (2017) 583–597.
- [35] V. Oliveri, G. Vecchio, 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective, *Eur. J. Med. Chem.* 120 (2016) 252–274.
- [36] Y. Song, H. Xu, W. Chen, P. Zhan, X. Liu, 8-Hydroxyquinoline: a privileged structure

- with a broad-ranging pharmacological potential, *Med. Chem. Commun.* 6 (2015) 61–74.
- [37] R.S. Eisenstein, Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism, *Annu. Rev. Nutr.* 20 (2000) 627–662.
- [38] P. Arosio, S. Levi, Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1800 (2010) 783–792.
- [39] D.S. Kalinowski, C. Stefani, S. Toyokuni, T. Ganz, G.J. Anderson, N. V. Subramaniam, D. Trinder, J.K. Olynyk, A. Chua, P.J. Jansson, S. Sahni, D.J.R. Lane, A.M. Merlot, Z. Kovacevic, M.L.H. Huang, C. Soon Lee, D.R. Richardson, Redox cycling metals: Pedaling their roles in metabolism and their use in the development of novel therapeutics, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863 (2016) 727–748.
- [40] J. Bartek, J. Bartkova, J. Lukas, DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression, *Oncogene.* 26 (2007) 7773–7779.
- [41] J.L. Heath, J.M. Weiss, C.P. Lavau, D.S. Wechsler, Iron deprivation in cancer-potential therapeutic implications, *Nutrients.* 5 (2013) 2836–2859.
- [42] A. Lawen, D.J.R. Lane, Mammalian Iron Homeostasis in Health and Disease: Uptake, Storage, Transport, and Molecular Mechanisms of Action, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 2473–2507.
- [43] S. Gulec, G.J. Anderson, J.F. Collins, Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 307 (2014) G397-409.
- [44] M.T. Worthington, S.M. Cohn, S.K. Miller, R.Q. Luo, C.L. Berg, Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280 (2001) G1172–G1177.
- [45] M. Shayeghi, G.O. Latunde-Dada, J.S. Oakhill, A.H. Laftah, K. Takeuchi, N. Halliday, Y. Khan, A. Warley, F.E. McCann, R.C. Hider, D.M. Frazer, G.J. Anderson, C.D. Vulpe, R.J. Simpson, A.T. McKie, Identification of an intestinal heme transporter, *Cell.* 122 (2005) 789–801.
- [46] A.H. Laftah, G.O. Latunde-Dada, S. Fakih, R.C. Hider, R.J. Simpson, A.T. McKie, Haem and folate transport by proton-coupled folate transporter/haem carrier protein 1

- (SLC46A1)., *Br. J. Nutr.* 101 (2009) 1150–6.
- [47] I. Yanatori, M. Tabuchi, Y. Kawai, Y. Yasui, R. Akagi, F. Kishi, Heme and non-heme iron transporters in non-polarized and polarized cells., *BMC Cell Biol.* 11 (2010) 39.
 - [48] A.T. McKie, An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron, *Science*. 291 (2001) 1755–1759.
 - [49] D.J.R. Lane, D.H. Bae, A.M. Merlot, S. Sahni, D.R. Richardson, Duodenal cytochrome b (DCYTB) in Iron metabolism: An update on function and regulation, *Nutrients*. 7 (2015) 2274–2296.
 - [50] P.M. Harrison, P. Arosio, The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1275 (1996) 161–203.
 - [51] T.R. Daniels, E. Bernabeu, J.A. Rodríguez, S. Patel, M. Kozman, D.A. Chiappetta, E. Holler, J.Y. Ljubimova, G. Helguera, M.L. Penichet, The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1820 (2012) 291–317.
 - [52] R.S. Ohgami, D.R. Campagna, E.L. Greer, B. Antiochos, A. McDonald, J. Chen, J.J. Sharp, Y. Fujiwara, J.E. Barker, M.D. Fleming, Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells, *Nat. Genet.* 37 (2005) 1264–1269.
 - [53] D.J.R. Lane, S. Chikhani, V. Richardson, D.R. Richardson, Transferrin iron uptake is stimulated by ascorbate via an intracellular reductive mechanism., *Biochim. Biophys. Acta*. 1833 (2013) 1527–41.
 - [54] M.W. Hentze, M.U. Muckenthaler, B. Galy, C. Camaschella, Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism, *Cell*. 142 (2010) 24–38.
 - [55] A. Jacobs, Low Molecular Weight Intracellular Iron Transport Compounds, *Blood*. 50 (1977) 433–439.
 - [56] M. Kruszewski, Labile iron pool: The main determinant of cellular response to oxidative stress, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 531 (2003) 81–92.
 - [57] C.P. Anderson, M. Shen, R.S. Eisenstein, E.A. Leibold, Mammalian iron metabolism

- and its control by iron regulatory proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823 (2012) 1468–1483.
- [58] M.L. Wallander, E.A. Leibold, R.S. Eisenstein, Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1763 (2006) 668–689.
 - [59] E. Nemeth, Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization, *Science*. 306 (2004) 2090–2093.
 - [60] O. Weizer-Stern, K. Adamsky, O. Margalit, O. Ashur-Fabian, D. Givol, N. Amariglio, G. Rechavi, Hepcidin, a key regulator of iron metabolism, is transcriptionally activated by p53, *Br. J. Haematol.* 138 (2007) 253–262.
 - [61] F. Zhang, W. Wang, Y. Tsuji, S. V. Torti, F.M. Torti, Post-transcriptional modulation of iron homeostasis during p53-dependent growth arrest, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 33911–33918.
 - [62] S. V. Torti, F.M. Torti, Iron and cancer: more ore to be mined, *Nat. Rev. Cancer*. 13 (2013) 342–355.
 - [63] N. Le, The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. 1603 (2002) 31–46.
 - [64] K.C. Gatter, G. Brown, I.S. Trowbridge, R.E. Woolston, D.Y. Mason, Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance., *J. Clin. Pathol.* 36 (1983) 539–545.
 - [65] D. Brooks, C. Taylor, B. Dos Santos, H. Linden, A. Houghton, T.T. Hecht, S. Kornfeld, R. Taetle, Phase Ia Trial of Murine Immunoglobulin A Antitransferrin Receptor Antibody 42/6, *Clin. Cancer Res.* 1 (1995) 1259–1265.
 - [66] R. Taetle, J. Castagnola, J. Mendelsohn, Mechanisms of Growth Inhibition by Anti-Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies, *Cancer Res.* 46 (1986) 1759–1763.
 - [67] J. Boulton, K. Roberts, M.J. Brookes, S. Hughes, J.P. Bury, S.S. Cross, G.J. Anderson, R. Spychal, T. Iqbal, C. Tselepis, Overexpression of cellular iron import proteins is associated with malignant progression of esophageal adenocarcinoma, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 379–387.

- [68] M.D. Knutson, Steap proteins: implications for iron and copper metabolism., *Nutr. Rev.* 65 (2007) 335–40.
- [69] C. V. Dang, MYC on the Path to Cancer, *Cell*. 149 (2012) 22–35.
- [70] K.-J. Wu, A. Polack, R. Dalla-Favera, Coordinated Regulation of Iron-Controlling Genes, H-Ferritin and IRP2, by c-MYC, *Science*. 283 (1999) 676–679.
- [71] S. Radulescu, M.J. Brookes, P. Salgueiro, R.A. Ridgway, E. McGhee, K. Anderson, S.J. Ford, D.H. Stones, T.H. Iqbal, C. Tselepis, O.J. Sansom, Luminal Iron Levels Govern Intestinal Tumorigenesis after Apc Loss In Vivo, *Cell Rep.* 2 (2012) 270–282.
- [72] O. Kakhlon, Y. Gruenbaum, Z.I. Cabantchik, Ferritin expression modulates cell cycle dynamics and cell responsiveness to H-ras-induced growth via expansion of the labile iron pool., *Biochem. J.* 363 (2002) 431–6.
- [73] S.I. Shpileva, V.P. Tryndyak, O. Kovalchuk, A. Starlard-Davenport, V.F. Chekhun, F.A. Beland, I.P. Pogribny, Role of ferritin alterations in human breast cancer cells, *Breast Cancer Res. Treat.* 126 (2011) 63–71.
- [74] Ding Cheng Yang, F. Wang, R.L. Elliott, J.F. Head, Expression of transferrin receptor and ferritin H-chain mRNA are associated with clinical and histopathological prognostic indicators in breast cancer, *Anticancer Res.* 21 (2001) 541–549.
- [75] A.M. Merlot, D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, Novel Chelators for Cancer Treatment: Where Are We Now?, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 973–1006.
- [76] L. Thelander, A. Gräslund, M. Thelander, Continual presence of oxygen and iron required for mammalian ribonucleotide reduction: Possible regulation mechanism, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110 (1983) 859–865.
- [77] M.B. Mannargudi, S. Deb, Clinical pharmacology and clinical trials of ribonucleotide reductase inhibitors: is it a viable cancer therapy?, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 143 (2017) 1499–1529.
- [78] M.C. Casimiro, M. Crosariol, E. Loro, Z. Li, R.G. Pestell, Cyclins and Cell Cycle Control in Cancer and Disease, *Genes Cancer*. 3 (2012) 649–657.
- [79] Y. Yu, Z. Kovacevic, D.R. Richardson, Tuning cell cycle regulation with an iron key,

Cell Cycle. 6 (2007) 1982–1994.

- [80] M. Cheng, P. Olivier, J.A. Diehl, M. Fero, M.F. Roussel, J.M. Roberts, C.J. Sherr, The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK “inhibitors” are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts., *EMBO J.* 18 (1999) 1571–83.
- [81] Y. Yu, Y.S. Rahmanto, D.R. Richardson, Bp44mT: An orally active iron chelator of the thiosemicarbazone class with potent anti-tumour efficacy, *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012) 148–166.
- [82] Z. Kovacevic, S. Chikhani, D.B. Lovejoy, D.R. Richardson, Novel Thiosemicarbazone Iron Chelators Induce Up-Regulation and Phosphorylation of the Metastasis Suppressor N-myc Down-Stream Regulated Gene 1: A New Strategy for the Treatment of Pancreatic Cancer, *Mol. Pharmacol.* 80 (2011) 598–609.
- [83] Y. Yu, E. Gutierrez, Z. Kovacevic, F. Saletta, P. Obeidy, Y. Suryo Rahmanto, D.R. Richardson, Iron Chelators for the Treatment of Cancer, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 2689–2702.
- [84] J. Gao, D.R. Richardson, The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents, IV: The mechanisms involved in inhibiting cell-cycle progression, *Blood*. 98 (2001) 842–850.
- [85] M. Cabrera, N. Gomez, F.R. Lenicov, E. Echeverría, C. Shayo, A. Moglioni, N. Fernández, C. Davio, G2/M cell cycle arrest and tumor selective apoptosis of acute leukemia cells by a promising benzophenone thiosemicarbazone compound, *PLoS One*. 10 (2015) e0136878.
- [86] E. Meulmeester, A.G. Jochemsen, P53: a Guide To Apoptosis., *Curr. Cancer Drug Targets*. 8 (2008) 87–97.
- [87] F. Saletta, Y. Suryo Rahmanto, E. Noulisri, D.R. Richardson, Iron chelator-mediated alterations in gene expression: identification of novel iron-regulated molecules that are molecular targets of hypoxia-inducible factor-1 alpha and p53., *Mol. Pharmacol.* 77 (2010) 443–458.
- [88] B.A. Fang, Ž. Kovačević, K.C. Park, D.S. Kalinowski, P.J. Jansson, D.J.R. Lane, S. Sahni, D.R. Richardson, Molecular functions of the iron-regulated metastasis suppressor,

- NDRG1, and its potential as a molecular target for cancer therapy, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. 1845 (2014) 1–19.
- [89] J. Blaes, M. Weiler, F. Sahm, B. Hentschel, M. Osswald, M. Czabanka, C.M. Thomé, M.G. Schliesser, S. Pusch, S. Luger, F. Winkler, A. Radbruch, M. Jugold, M. Simon, J.P. Steinbach, G. Schackert, M. Tatagiba, M. Westphal, J.C. Tonn, D. Gramatzki, T. Pietsch, C. Hartmann, H. Glimm, P. Vajkoczy, A. von Deimling, M. Platten, M. Weller, W. Wick, NDRG1 prognosticates the natural course of disease in WHO grade II glioma, *J. Neurooncol.* 117 (2014) 25–32.
 - [90] K. Matsushita, K. Uchida, S. Saigusa, S. Ide, K. Hashimoto, Y. Koike, K. Otake, M. Inoue, K. Tanaka, M. Kusunoki, Low NDRG1 mRNA expression predicts a poor prognosis in neuroblastoma patients, *Pediatr. Surg. Int.* 29 (2013) 363–368.
 - [91] X. Wangpu, X. Yang, J. Zhao, J. Lu, S. Guan, J. Lu, Z. Kovacevic, W. Liu, L. Mi, R. Jin, J. Sun, F. Yue, J. Ma, A. Lu, D.R. Richardson, L. Wang, M. Zheng, The metastasis suppressor, NDRG1, inhibits “stemness” of colorectal cancer via down-regulation of nuclear beta-catenin and CD44., *Oncotarget.* 6 (2015) 33893–33911.
 - [92] K.M. Dixon, G.Y.L. Lui, Z. Kovacevic, D. Zhang, M. Yao, Z. Chen, Q. Dong, S.J. Assinder, D.R. Richardson, Dp44mT targets the AKT, TGF- β and ERK pathways via the metastasis suppressor NDRG1 in normal prostate epithelial cells and prostate cancer cells, *Br. J. Cancer.* 108 (2013) 409–419.
 - [93] Z. Kovacevic, S. V. Menezes, S. Sahni, D.S. Kalinowski, D.H. Bae, D.J.R. Lane, D.R. Richardson, The metastasis suppressor, N-MYC downstream-regulated gene-1 (NDRG1), down-regulates the ErbB family of receptors to inhibit downstream oncogenic signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 1029–1052.
 - [94] Z. Kovacevic, S. Sivagurunathan, H. Mangs, S. Chikhani, D. Zhang, D.R. Richardson, The metastasis suppressor, N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1), upregulates p21 via p53-independent mechanisms, *Carcinogenesis.* 32 (2011) 732–740.
 - [95] J. Sun, D. Zhang, Y. Zheng, Q. Zhao, M. Zheng, Z. Kovacevic, D.R. Richardson, Targeting the metastasis suppressor, NDRG1, using novel iron chelators: regulation of stress fiber-mediated tumor cell migration via modulation of the ROCK1/pMLC2 signaling pathway., *Mol. Pharmacol.* 83 (2013) 454–69.

- [96] Z. Chen, D. Zhang, F. Yue, M. Zheng, Z. Kovacevic, D.R. Richardson, The iron chelators Dp44mT and DFO inhibit TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of N-Myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1), *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 17016–17028.
- [97] N.T. V Le, D.R. Richardson, Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: A link between iron metabolism and proliferation, *Blood*. 104 (2004) 2967–2975.
- [98] D. Kalinowski, D. Richardson, The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 547–583.
- [99] D.S. Kalinowski, Y. Yu, P.C. Sharpe, M. Islam, Y.T. Liao, D.B. Lovejoy, N. Kumar, P.V. Bernhardt, D.R. Richardson, Design, synthesis, and characterization of novel iron chelators: Structure-activity relationships of the 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series and their 3-nitrobenzoyl analogues as potent antitumor agents, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 3716–3729.
- [100] D.R. Richardson, P.C. Sharpe, D.B. Lovejoy, D. Senaratne, D.S. Kalinowski, M. Islam, P.V. Bernhardt, Dipyriddy thiosemicarbazone chelators with potent and selective antitumor activity form iron complexes with redox activity, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 6510–6521.
- [101] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160 (2006) 1–40.
- [102] M.L. Circu, T.Y. Aw, Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 749–762.
- [103] P. Kovacic, J. Osuna Jr., Mechanisms of Anti-Cancer Agents Emphasis on Oxidative Stress and Electron Transfer, *Curr Pharm Des.* 6 (2000) 277–309.
- [104] K.C. Cheng, D.S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura, L.A. Loeb, 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 166–172.
- [105] K. Rahman, Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors., *Clin. Interv. Aging.* 2 (2007) 219–236.

- [106] S. Loft, H.E. Poulsen, Cancer risk and oxidative DNA damage in man, *J. Mol. Med.* 74 (1996) 297–312.
- [107] G. Manda, M.T. Nechifor, T.-M. Neagu, Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies, *Curr. Chem. Biol.* 3 (2009) 342–366.
- [108] H.A. Askautrud, E. Gjernes, G. Gunnes, M. Sletten, D.T. Ross, A.L. Brøresen-Dale, N. Iversen, M.A. Tranulis, E. Frengen, Global gene expression analysis reveals a link between NDRG1 and vesicle transport, *PLoS One.* 9 (2014) 1–8.
- [109] D. Horn, A. Barrientos, Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome C oxidase, *IUBMB Life.* 60 (2008) 421–429.
- [110] M. Arredondo, M.T. Núñez, Iron and copper metabolism, *Mol. Aspects Med.* 26 (2005) 313–327.
- [111] R.A. Festa, D.J. Thiele, Copper: An essential metal in biology, *Curr. Biol.* 21 (2011) R877-83.
- [112] U. Jungwirth, C.R. Kowol, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, W. Berger, P. Heffeter, Anticancer Activity of Metal Complexes: Involvement of Redox Processes, *Antioxid. Redox Signal.* 15 (2011) 1085–1127.
- [113] Y. Yoshida, S. Furuta, E. Niki, Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1210 (1993) 81–88.
- [114] B. Lönnerdal, Bioavailability of copper, *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (1996) 821S–9S.
- [115] J. Lee, M.J. Petris, D.J. Thiele, Characterization of mouse embryonic cells deficient in the Ctr1 high affinity copper transporter: Identification of a Ctr1-independent copper transport system, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 40253–40259.
- [116] B.G. Blair, C. Larson, R. Safaei, S.B. Howell, Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of cisplatin and carboplatin, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 4312–4321.
- [117] M. Arredondo, M.J. Mendiburo, S. Flores, S.T. Singleton, M.D. Garrick, Mouse divalent metal transporter 1 is a copper transporter in HEK293 cells, *BioMetals.* 27 (2014) 115–

- [118] N.K.Y. Wee, D.C. Weinstein, S.T. Fraser, S.J. Assinder, The mammalian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) 960–963.
- [119] T.Z. Kidane, R. Farhad, K.J. Lee, A. Santos, E. Russo, M.C. Linder, Uptake of copper from plasma proteins in cells where expression of CTR1 has been modulated, *BioMetals.* 25 (2012) 697–709.
- [120] M.L. Turski, D.J. Thiele, New Roles for Copper Metabolism in Cell Proliferation, Signaling, and Disease, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 717–721.
- [121] E.D. Harris, Cellular copper transport and metabolism, *Annu. Rev. Nutr.* 20 (2000) 291–310.
- [122] M.C. Linder, M. Hazegh-Azam, Copper biochemistry and molecular biology., *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (1996) 797S–811S.
- [123] M. Linder, L. Wooten, P. Cerveza, S. Cotton, R. Shulze, N. Lomeli, Copper transport., *Am. J. Clin. Nutr.* 67 (1998) 965S–971S.
- [124] S. Lutsenko, Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 211–217.
- [125] H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew, Trace elements in human physiology and pathology. Copper, *Biomed. Pharmacother.* 57 (2003) 386–398.
- [126] S. Tardito, L. Marchiò, Copper compounds in anticancer strategies., *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 1325–1348.
- [127] T. Wang, Z. Guo, Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design., *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 525–537.
- [128] M.C. Carroll, J.B. Girouard, J.L. Ulloa, J.R. Subramaniam, P.C. Wong, J.S. Valentine, V.C. Culotta, Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004) 5964–5969.
- [129] E.B. Maryon, S.A. Molloy, J.H. Kaplan, Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1, *AJP Cell Physiol.* 304 (2013) C768–

C779.

- [130] L. Banci, I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, T. Kozyreva, K. Zovo, P. Palumaa, Affinity gradients drive copper to cellular destinations, *Nature*. 465 (2010) 645–648.
- [131] S. La Fontaine, J.F.B. Mercer, Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: Role in copper homeostasis, *Arch. Biochem. Biophys.* 463 (2007) 149–167.
- [132] G. Inesi, R. Pilankatta, F. Tadini-Buoninsegni, Biochemical characterization of P-type copper ATPases, *Biochem J.* 463 (2014) 167–176.
- [133] S. Lutsenko, N.L. Barnes, M.Y. Bartee, O.Y. Dmitriev, Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 1011–1046.
- [134] J.R. Prohaska, Role of copper transporters in copper homeostasis, in: *Am. J. Clin. Nutr.* 88 (2008) 826S–9S.
- [135] H. Ohrvik, Y. Nose, L.K. Wood, B.-E. Kim, S.-C. Gleber, M. Ralle, D.J. Thiele, Ctr2 regulates biogenesis of a cleaved form of mammalian Ctr1 metal transporter lacking the copper- and cisplatin-binding ecto-domain, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) E4279–E4288.
- [136] A.R. Mufti, E. Burstein, C.S. Duckett, XIAP: Cell death regulation meets copper homeostasis, *Arch. Biochem. Biophys.* 463 (2007) 168–174.
- [137] G.N. Maine, X. Mao, P.A. Muller, C.M. Komarck, L.W.J. Klomp, E. Burstein, COMMD1 expression is controlled by critical residues that determine XIAP binding, *J. Biochem.* 417 (2009) 601–609.
- [138] D. Denoyer, S. Masaldan, S. La Fontaine, M.A. Cater, Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer,” *Metallomics*. 7 (2015) 1459–1476.
- [139] A. Gupte, R.J. Mumper, Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment, *Cancer Treat. Rev.* 35 (2009) 32–46.
- [140] H.W. Kuo, S.F. Chen, C.C. Wu, D.R. Chen, J.H. Lee, Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan., *Biol. Trace Elem. Res.* 89 (2002) 1–11.
- [141] K. Sharma, D.K. Mittal, R.C. Kesarwani, V.P. Kamboj, Chowdery, Diagnostic and prognostic significance of serum and tissue trace elements in breast malignancy, *Indian*

- J. Med. Sci.* 48 (1994) 227–232.
- [142] S.K. Gupta, V.K. Shukla, M.P. Vaidya, S.K. Roy, S. Gupta, Serum and tissue trace elements in colorectal cancer, *J. Surg. Oncol.* 52 (1993) 172–175.
 - [143] A. Nasulewicz, A. Mazur, A. Opolski, Role of copper in tumour angiogenesis—clinical implications, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18 (2004) 1–8.
 - [144] G.D. Kaiafa, Z. Saouli, M.D. Diamantidis, Z. Kontoninas, V. Voulgaridou, M. Raptaki, S. Arampatzi, M. Chatzidimitriou, V. Perifanis, Copper levels in patients with hematological malignancies, *Eur. J. Intern. Med.* 23 (2012) 738–741.
 - [145] S. Majumder, S. Chatterjee, S. Pal, J. Biswas, T. Efferth, S.K. Choudhuri, The role of copper in drug-resistant murine and human tumors, *BioMetals.* 22 (2009) 377–384.
 - [146] S. Majumder, P. Dutta, S. Choudhuri, The Role of Copper in Development of Drug Resistance in Murine Carcinoma, *Med. Chem.* 1 (2005) 563–573.
 - [147] M.C. Linder, J.R. Moor, K. Wright, Ceruloplasmin assays in diagnosis and treatment of human lung, breast, and gastrointestinal cancers, *J. Natl. Cancer Inst.* 67 (1981) 263–275.
 - [148] A. Senra Varela, J.J.B. Lopez Saez, D. Quintela Senra, Serum ceruloplasmin as a diagnostic marker of cancer, *Cancer Lett.* 121 (1997) 139–145.
 - [149] E.D. Harris, A requirement for copper in angiogenesis, *Nutr. Rev.* 62 (2004) 60–64.
 - [150] N. Weidner, P.R. Carroll, J. Flax, W. Blumenfeld, J. Folkman, Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma, *Am. J. Pathol.* 143 (1993) 401–9.
 - [151] L. Finney, S. Vogt, T. Fukai, D. Glesne, Copper and angiogenesis: Unravelling a relationship key to cancer progression, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36 (2009) 88–94.
 - [152] P. Carmeliet, R.K. Jain, Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis, *Nature.* 473 (2011) 298–307.
 - [153] B.R. McAuslan, W. Reilly, Endothelial cell phagokinesis in response to specific metal ions, *Exp. Cell Res.* 130 (1980) 147–157.

- [154] G.-F. Hu, Copper Stimulates Proliferation of Human Endothelial Cells Under Culture, *J. Cell. Biochem.* 69 (1998) 326–335.
- [155] F. Soncin, J.D. Guitton, T. Cartwright, J. Badet, Interaction of human angiogenin with copper modulates angiogenin binding to endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 (1997) 604–610.
- [156] C.K. Sen, S. Khanna, M. Venojarvi, P. Trikha, E.C. Ellison, T.K. Hunt, S. Roy, Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing, *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 282 (2002) H1821–H1827.
- [157] Q. Pan, C.G. Kleer, K.L. Van Golen, J. Irani, K.M. Bottema, C. Bias, M. De Carvalho, E.A. Mesri, D.M. Robins, R.D. Dick, G.J. Brewer, S.D. Merajver, Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis, *Cancer Res.* 62 (2002) 4854–4859.
- [158] L. Wang, Y. Ge, Y.J. Kang, Featured Article: Effect of copper on nuclear translocation of copper chaperone for superoxide dismutase-1, *Exp. Biol. Med.* 241 (2016) 1483–1488.
- [159] W. Feng, F. Ye, W. Xue, Z. Zhou, Y.J. Kang, Copper Regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 Activity, *Mol. Pharmacol.* 75 (2009) 174–182.
- [160] S. Itoh, H.W. Kim, O. Nakagawa, K. Ozumi, S.M. Lessner, H. Aoki, K. Akram, R.D. McKinney, M. Ushio-Fukai, T. Fukai, Novel Role of Antioxidant-1 (Atox1) as a Copper-dependent Transcription Factor Involved in Cell Proliferation, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 9157–9167.
- [161] T. Kohno, N. Urao, T. Ashino, V. Sudhahar, R.D. McKinney, T. Hamakubo, H. Iwanari, M. Ushio-Fukai, T. Fukai, Novel role of copper transport protein antioxidant-1 in neointimal formation after vascular injury, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33 (2013) 805–813.
- [162] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents, *Chem. Rev.* 114 (2014) 815–862.
- [163] M. Fatfat, R.A. Merhi, O. Rahal, D.A. Stoyanovsky, A. Zaki, H. Haidar, V.E. Kagan, H. Gali-Muhtasib, K. Machaca, Copper chelation selectively kills colon cancer cells through redox cycling and generation of reactive oxygen species, *BMC Cancer.* 14

(2014) 527.

- [164] D.C. Brady, M.S. Crowe, M.L. Turski, G.A. Hobbs, X. Yao, A. Chaikuad, S. Knapp, K. Xiao, S.L. Campbell, D.J. Thiele, C.M. Counter, Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis, *Nature*. 509 (2014) 492–496.
- [165] ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
- [166] B.J. Schneider, J.S.J. Lee, J.A. Hayman, A.C. Chang, M.B. Orringer, A. Pickens, C.C. Pan, S.D. Merajver, S.G. Urba, Pre-operative chemoradiation followed by post-operative adjuvant therapy with tetrathiomolybdate, a novel copper chelator, for patients with resectable esophageal cancer, *Invest. New Drugs*. 31 (2013) 435–442.
- [167] S. Jain, J. Cohen, M.M. Ward, N. Kornhauser, E. Chuang, T. Cigler, A. Moore, D. Donovan, C. Lam, M.V. Cobham, S. Schneider, S.M. Hurtado Rúa, S. Benkert, C. Mathijssen Greenwood, R. Zelkowitz, J.D. Warren, M.E. Lane, V. Mittal, S. Rafii, L.T. Vahdat, Tetrathiomolybdate-associated copper depletion decreases circulating endothelial progenitor cells in women with breast cancer at high risk of relapse, *Ann. Oncol.* 24 (2013) 1491–1498.
- [168] E.M. Gartner, K.A. Griffith, Q. Pan, G.J. Brewer, G.F. Henja, S.D. Merajver, M.M. Zalupski, A pilot trial of the anti-angiogenic copper lowering agent tetrathiomolybdate in combination with irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer, *Invest. New Drugs*. 27 (2009) 159–165.
- [169] Q. Pan, L.W. Bao, S.D. Merajver, Tetrathiomolybdate inhibits angiogenesis and metastasis through suppression of the NFkappaB signaling cascade, *Mol. Cancer Res.* 1 (2003) 701–706.
- [170] S. Ishida, P. Andreux, C. Poitry-Yamate, J. Auwerx, D. Hanahan, Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) 19507–19512.
- [171] S.S. Brem, D. Zagzag, A.M. Tsanaclis, S. Gately, M.P. Elkouby, S.E. Brien, Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor., *Am. J. Pathol.* 137 (1990) 1121–1142.

- [172] Q. Pan, L.W. Bao, C.G. Kleer, G.J. Brewer, S.D. Merajver, Antiangiogenic tetrathiomolybdate enhances the efficacy of doxorubicin against breast carcinoma, *Mol. Cancer Ther.* 2 (2003) 617–622.
- [173] S. Jazayeri, A. Feli, M.A. Bitaraf, M.S. Dodaran, M. Alikhani, M.J. Hosseinzadeh-Attar, Effects of copper reduction on angiogenesis-related factors in recurrent glioblastoma cases, *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 17 (2016) 4609–4614.
- [174] W.Q. Ding, S.E. Lind, Metal ionophores - An emerging class of anticancer drugs, *IUBMB Life.* 61 (2009) 1013–1018.
- [175] M.E. Helsel, K.J. Franz, Pharmacological activity of metal binding agents that alter copper bioavailability, *Dalt. Trans.* 44 (2015) 8760–8770.
- [176] I. Alfonso, R. Quesada, Biological activity of synthetic ionophores: ion transporters as prospective drugs?, *Chem. Sci.* 4 (2013) 3009.
- [177] J.L. Allensworth, M.K. Evans, F. Bertucci, A.J. Aldrich, R.A. Festa, P. Finetti, N.T. Ueno, R. Safi, D.P. McDonnell, D.J. Thiele, S. Van Laere, G.R. Devi, Disulfiram (DSF) acts as a copper ionophore to induce copper-dependent oxidative stress and mediate anti-tumor efficacy in inflammatory breast cancer, *Mol. Oncol.* 9 (2015) 1155–1168.
- [178] M.A. Cater, H.B. Pearson, K. Wolyniec, P. Klaver, M. Bilandzic, B.M. Paterson, A.I. Bush, P.O. Humbert, S. La Fontaine, P.S. Donnelly, Y. Haupt, Increasing intracellular bioavailable copper selectively targets prostate cancer cells, *ACS Chem. Biol.* 8 (2013) 1621–1631.
- [179] M.D. Brand, D.G. Nicholls, M.A. Cater, Y. Haupt, Assessing mitochondrial dysfunction in cells Clioquinol induces cytoplasmic clearance of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP): therapeutic indication for prostate cancer, *Biochem. J.* 437 (2011) 575–576.
- [180] L. Duan, H. Shen, G. Zhao, R. Yang, X. Cai, L. Zhang, C. Jin, Y. Huang, Inhibitory effect of Disulfiram/copper complex on non-small cell lung cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446 (2014) 1010–1016.
- [181] R. Safi, E.R. Nelson, S.K. Chitneni, K.J. Franz, D.J. George, M.R. Zalutsky, D.P. McDonnell, Copper signaling axis as a target for prostate cancer therapeutics, *Cancer*

Res. 74 (2014) 5819–5831.

- [182] H. Zhang, D. Chen, J. Ringler, W. Chen, Q.C. Cui, S.P. Ethier, Q.P. Dou, G. Wu, Disulfiram treatment facilitates phosphoinositide 3-kinase inhibition in human breast cancer cells in vitro and in vivo, *Cancer Res.* 70 (2010) 3996–4004.
- [183] S.S. Brar, C. Grigg, K.S. Wilson, W.D. Holder Jr., D. Dreau, C. Austin, M. Foster, A.J. Ghio, A.R. Whorton, G.W. Stowell, L.B. Whittall, R.R. Whittle, D.P. White, T.P. Kennedy, Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease, *Mol Cancer Ther.* 3 (2004) 1049–1060.
- [184] A.D. Schimmer, Y. Jitkova, M. Gronda, Z. Wang, J. Brandwein, C. Chen, V. Gupta, A. Schuh, K. Yee, J. Chen, S. Ackloo, T. Booth, S. Keays, M.D. Minden, A phase I study of the metal ionophore clioquinol in patients with advanced hematologic malignancies, *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* 12 (2012) 330–336.
- [185] J. Huang, J.L. Campian, A.D. Gujar, D.D. Tran, A.C. Lockhart, T.A. DeWees, C.I. Tsien, A.H. Kim, A phase I study to repurpose disulfiram in combination with temozolomide to treat newly diagnosed glioblastoma after chemoradiotherapy, *J. Neurooncol.* 128 (2016) 259–266.
- [186] P. Liu, S. Brown, T. Goktug, P. Channathodiyil, V. Kannappan, J.-P. Hugnot, P.O. Guichet, X. Bian, A.L. Armesilla, J.L. Darling, W. Wang, Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells, *Br. J. Cancer.* 107 (2012) 1488–1497.
- [187] C. Rae, M. Tesson, J.W. Babich, M. Boyd, A. Sorensen, R.J. Mairs, The Role of Copper in Disulfiram-Induced Toxicity and Radiosensitization of Cancer Cells, *J. Nucl. Med.* 54 (2013) 953–960.
- [188] E. Burstein, L. Ganesh, R.D. Dick, B. Van De Sluis, J.C. Wilkinson, L.W. Klomp, C. Wijmenga, G.J. Brewer, G.J. Nabel, C.S. Duckett, A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1, *EMBO J.* 23 (2004) 244–254.
- [189] M.A. Cater, Y. Haupt, Clioquinol induces cytoplasmic clearance of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP): therapeutic indication for prostate cancer,

- Biochem. J.* 436 (2011) 481–491.
- [190] K.G. Daniel, D. Chen, S. Orlu, Q.C. Cui, F.R. Miller, Q.P. Dou, Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells, *Breast Cancer Res.* 7 (2005) R897.
- [191] K.G. Daniel, P. Gupta, R.H. Harbach, W.C. Guida, Q.P. Dou, Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells, *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 1139–1151.
- [192] B. Selvakumar, V. Rajendiran, P. Uma Maheswari, H. Stoeckli-Evans, M. Palaniandavar, Structures, spectra, and DNA-binding properties of mixed ligand copper(II) complexes of iminodiacetic acid: The novel role of diimine co-ligands on DNA conformation and hydrolytic and oxidative double strand DNA cleavage, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 316–330.
- [193] D. Wang, S.J. Lippard, Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 307–320.
- [194] J.L. García-Giménez, G. Alzuet, M. González-Álvarez, M. Liu-González, A. Castiñeiras, J. Borrás, Oxidative nuclease activity of ferromagnetically coupled μ -hydroxo- μ -propionato copper(II) complexes $[\text{Cu}_3(\text{L})_2(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-propionato})_2]$ ($\text{L} = \text{N}-(\text{pyrid-2-ylmethyl})\text{R-sulfonamidato}$, $\text{R} = \text{benzene, toluene, naphthalene}$), *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 243–255.
- [195] J. Tan, B. Wang, L. Zhu, DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper(II) complex: Potential mechanism of its antitumor properties, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 727–739.
- [196] A. Chakraborty, P. Kumar, K. Ghosh, P. Roy, Evaluation of a Schiff base copper complex compound as potent anticancer molecule with multiple targets of action, *Eur. J. Pharmacol.* 647 (2010) 1–12.
- [197] S. Tardito, A. Barilli, I. Bassanetti, M. Tegoni, O. Bussolati, R. Franchi-Gazzola, C. Mucchino, L. Marchiò, Copper-dependent cytotoxicity of 8-hydroxyquinoline derivatives correlates with their hydrophobicity and does not require caspase activation, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 10448–10459.

- [198] V. Gandin, M. Pellei, F. Tisato, M. Porchia, C. Santini, C. Marzano, A novel copper complex induces paraptosis in colon cancer cells via the activation of ER stress signalling, *J. Cell. Mol. Med.* 16 (2012) 142–151.
- [199] C. Gorrini, I.S. Harris, T.W. Mak, Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 931–947.
- [200] D. Trachootham, W. Lu, M.A. Ogasawara, N.R.-D. Valle, P. Huang, Redox Regulation of Cell Survival, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (2008) 1343–1374.
- [201] B.B.A. Simone Reuter, Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?, *Free Radic Biol Med.* 49 (2011) 1603–1616.
- [202] E.O. Hileman, J. Liu, M. Albitar, M.J. Keating, P. Huang, Intrinsic oxidative stress in cancer cells: A biochemical basis for therapeutic selectivity, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 53 (2004) 209–219.
- [203] J. Chen, Reactive Oxygen Species and Drug Resistance in Cancer Chemotherapy, *Austin J Clin Pathol.* 1 (2014) 1–7.
- [204] D. Zhou, L. Shao, D.R. Spitz, Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells, *Adv. Cancer Res.* 122 (2014) 1–67.
- [205] D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?, *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 579–591.
- [206] V. Nogueira, N. Hay, Molecular pathways: Reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy, *Clin. Cancer Res.* 19 (2013) 4309–4314.
- [207] G.-Y. Liou, P. Storz, Reactive oxygen species in cancer, *Free Radic. Res.* 44 (2010) 479–496.
- [208] H. Pelicano, D. Carney, P. Huang, ROS stress in cancer cells and therapeutic implications, *Drug Resist. Updat.* 7 (2004) 97–110.
- [209] M. De Miguel, M.D. Cordero, Oxidative Therapy Against Cancer, Oxidative Ther. Against Cancer, Oxidative Stress Dis. Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.), ISBN 978-953-51-0552-7, InTech. (2012) 497–520.
- [210] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes, J. Telser, Role of oxygen radicals in

- DNA damage and cancer incidence, *Mol. Cell. Biochem.* 266 (2004) 37–56.
- [211] K. Jomova, S. Baros, M. Valko, Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems, *Transit. Met. Chem.* 37 (2012) 127–134.
- [212] D.G. Deavall, E.A. Martin, J.M. Horner, R. Roberts, Drug-induced oxidative stress and toxicity, *J. Toxicol.* 2012 (2012) 645460.
- [213] S. Sreevalsan, S. Safe, Reactive oxygen species and colorectal cancer, *Curr. Colorectal Cancer Rep.* 9 (2013) 350–357.
- [214] L. Zhang, J. Li, L. Zong, X. Chen, K. Chen, Z. Jiang, L. Nan, X. Li, W. Li, T. Shan, Q. Ma, Z. Ma, Reactive Oxygen Species and Targeted Therapy for Pancreatic Cancer., *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016 (2016) 1616781.
- [215] M. Polimeni, E. Gazzano, Is redox signaling a feasible target for overcoming multidrug resistance in cancer chemotherapy?, *Front. Pharmacol.* 5 (2014) 286.
- [216] L.I. Mclellan, C.R. Wolf, Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance, *Drug Resist. Updat.* 2 (1999) 153–164.
- [217] A. Cort, T. Ozben, L. Saso, C. De Luca, L. Korkina, Redox Control of Multidrug Resistance and Its Possible Modulation by Antioxidants, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016 (2016) 1–17.
- [218] A.K. Godwin, A. Meister, P.J. O'Dwyer, C.S. Huang, T.C. Hamilton, M.E. Anderson, High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 (1992) 3070–3074.
- [219] S. Sertel, M. Tome, M.M. Briehl, J. Bauer, K. Hock, P.K. Plinkert, T. Efferth, Factors determining sensitivity and resistance of tumor cells to arsenic trioxide, *PLoS One.* 7 (2012) e35584.
- [220] X. Sui, N. Kong, L. Ye, W. Han, J. Zhou, Q. Zhang, C. He, H. Pan, p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents, *Cancer Lett.* 344 (2014) 174–179.
- [221] S. Ding, M. Chamberlain, A. McLaren, L. Goh, I. Duncan, C.R. Wolf, Cross-talk between signalling pathways and the multidrug resistant protein MDR-1., *Br. J. Cancer.*

85 (2001) 1175–84.

- [222] K.C. Das, C.W. White, Redox systems of the cell: Possible links and implications, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 9617–9618.
- [223] Y. Collins, E.T. Chouchani, A.M. James, K.E. Menger, H.M. Cocheme, M.P. Murphy, Mitochondrial redox signalling at a glance, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 1837–1837.
- [224] W. Davis, Z. Ronai, K.D. Tew, Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296 (2001) 1–6.
- [225] A. Glasauer, N.S. Chandel, Targeting antioxidants for cancer therapy, *Biochem. Pharmacol.* 92 (2014) 90–101.
- [226] E.H. Sarsour, A.L. Kalen, Z. Xiao, T.D. Veenstra, L. Chaudhuri, S. Venkataraman, P. Reigan, G.R. Buettner, P.C. Goswami, Manganese superoxide dismutase regulates a metabolic switch during the mammalian cell cycle, *Cancer Res.* 72 (2012) 3807–3816.
- [227] E.H. Sarsour, A.L. Kalen, P.C. Goswami, Manganese superoxide dismutase regulates a redox cycle within the cell cycle., *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 1618–27.
- [228] E.H. Sarsour, M.G. Kumar, L. Chaudhuri, A.L. Kalen, P.C. Goswami, Redox Control of the Cell Cycle in Health and Disease, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 2985–3011.
- [229] T. Finkel, Signal transduction by reactive oxygen species, *J. Cell Biol.* 194 (2011) 7–15.
- [230] W. Bechtel, G. Bauer, Catalase protects tumor cells from apoptosis induction by intercellular ROS signaling, *Anticancer Res.* 29 (2009) 4541–4557.
- [231] R. Franco, J.A. Cidlowski, Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 1303–1314.
- [232] R. Franco, C.D. Bortner, I. Schmitz, J.A. Cidlowski, Glutathione depletion regulates both extrinsic and intrinsic apoptotic signaling cascades independent from multidrug resistance protein 1, *Apoptosis.* 19 (2014) 117–134.
- [233] R. Franco, J.A. Cidlowski, Glutathione Efflux and Cell Death, *Antioxid. Redox Signal.* 17 (2012) 1694–1713.
- [234] N. Traverso, R. Ricciarelli, M. Nitti, B. Marengo, A.L. Furfaro, M.A. Pronzato, U.M.

- Marinari, C. Domenicotti, Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013 (2013) 972913.
- [235] M. Benhar, D. Engelberg, A. Levitzki, ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer, *EMBO Rep.* 3 (2002) 420–425.
- [236] J.M. Kyriakis, J. Avruch, Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation, *Physiol Rev.* 81 (2001) 807–869.
- [237] R.J. Davis, Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases, *Cell.* 103 (2000) 239–252.
- [238] Y. Yu, D.R. Richardson, Cellular iron depletion stimulates the JNK and p38 MAPK signaling transduction pathways, dissociation of ASK1-thioredoxin, and activation of ASK1, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 15413–15427.
- [239] R.T. Dean, P. Nicholson, The action of nine chelators on iron-dependent radical damage, *Free Radic. Res.* 20 (1994) 83–101.
- [240] D.N. Dhanasekaran, E.P. Reddy, JNK signaling in apoptosis, *Oncogene.* 27 (2008) 6245–6251.
- [241] S. a Susin, H.K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B.E. Snow, G.M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D.R. Goodlett, R. Aebersold, D.P. Siderovski, J.M. Penninger, G. Kroemer, Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor., *Nature.* 397 (1999) 441–446.
- [242] S.P. Cregan, V.L. Dawson, R.S. Slack, Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death, *Oncogene.* 23 (2004) 2785–2796.
- [243] M.R. Bedford, S.J. Ford, R.D. Horniblow, T.H. Iqbal, C. Tselepis, Iron chelation in the treatment of cancer: A new role for deferasirox?, *J. Clin. Pharmacol.* 53 (2013) 885–891.
- [244] A. Ceci, M. Felisi, V. De Sanctis, D. De Mattia, Pharmacotherapy of iron overload in thalassaemic patients., *Expert Opin. Pharmacother.* 4 (2003) 1763–74.
- [245] D.S. Kalinowski, The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload

- Disease and Cancer, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 547–583.
- [246] Z. Estrov, A. Tawa, X.H. Wang, I.D. Dubé, H. Sulh, A. Cohen, E.W. Gelfand, M.H. Freedman, In vitro and in vivo effects of deferoxamine in neonatal acute leukemia, *Blood*. 69 (1987) 757–61.
- [247] J. Blatt, S. Stitely, Antineuroblastoma Activity of Desferoxamine in Human Cell Lines, *Cancer Res.* 47 (1987) 1749–1750.
- [248] J. Blatt, S.R. Taylor, S. Stitely, Mechanism of antineuroblastoma activity of deferoxamine in vitro, *J. Lab. Clin. Med.* 112 (1988) 433–436.
- [249] A. Donfrancesco, G. Deb, C. Dominici, D. Pileggi, M.A. Castello, L. Helson, Effects of a Single Course of Deferoxamine in Neuroblastoma Patients, *Cancer Res.* 50 (1990) 4929–4930.
- [250] T. Yamasaki, S. Terai, I. Sakaida, Deferoxamine for Advanced Hepatocellular Carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 365 (2011) 576–578.
- [251] N.F. Olivieri, G.M. Brittenham, Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia., *Blood*. 89 (1997) 739–61.
- [252] P. V. Bernhardt, Coordination chemistry and biology of chelators for the treatment of iron overload disorders, *Dalt. Trans.* (2007) 3214.
- [253] K. Chantrel-Groussard, F. Gaboriau, N. Padeloup, R. Havouis, H. Nick, J.L. Pierre, P. Brissot, G. Lescoat, The new orally active iron chelator ICL670A exhibits a higher antiproliferative effect in human hepatocyte cultures than O-trensox, *Eur. J. Pharmacol.* 541 (2006) 129–137.
- [254] G.Y.L. Lui, P. Obeidy, S.J. Ford, C. Tselepis, D.M. Sharp, P.J. Jansson, D.S. Kalinowski, Z. Kovacevic, D.B. Lovejoy, D.R. Richardson, The Iron Chelator, Deferasirox, as a Novel Strategy for Cancer Treatment: Oral Activity Against Human Lung Tumor Xenografts and Molecular Mechanism of Action, *Mol. Pharmacol.* 83 (2013) 179–190.
- [255] E. Messa, S. Carturan, C. Maffè, M. Pautasso, E. Bracco, A. Roetto, F. Messa, F. Arruga, I. Defilippi, V. Rosso, C. Zanone, A. Rotolo, E. Greco, R.M. Pellegrino, D. Alberti, G. Saglio, D. Cilloni, Deferasirox is a powerful NF-kb inhibitor in myelodysplastic cells and in leukemia cell lines acting independently from cell iron deprivation by chelation

- and reactive oxygen species scavenging, *Haematologica*. 95 (2010) 1308–1316.
- [256] T. Fukushima, H. Kawabata, T. Nakamura, H. Iwao, A. Nakajima, M. Miki, T. Sakai, T. Sawaki, Y. Fujita, M. Tanaka, Y. Masaki, Y. Hirose, H. Umehara, Iron chelation therapy with deferasirox induced complete remission in a patient with chemotherapy-resistant acute monocytic leukemia, *Anticancer Res.* 31 (2011) 1741–1744.
- [257] C. Stefani, G. Punnia-Moorthy, D.B. Lovejoy, P.J. Jansson, D.S. Kalinowski, P.C. Sharpe, P.V. Bernhardt, D.R. Richardson, Halogenated 2'-Benzoylpyridine Thiosemicarbazone (XBpT) Chelators with Potent and Selective Anti-Neoplastic Activity: Relationship to Intracellular Redox Activity, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 6936–6948.
- [258] D.R. Richardson, D.S. Kalinowski, S. Lau, P.J. Jansson, D.B. Lovejoy, Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1790 (2009) 702–717.
- [259] M. Serda, D.S. Kalinowski, N. Rasko, E. Potůčková, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musiol, J.G. Małecki, M. Sajewicz, A. Ratuszna, A. Muchowicz, J. Gołąb, T. Simunek, D.R. Richardson, J. Polanski, Exploring the Anti-Cancer Activity of Novel Thiosemicarbazones Generated through the Combination of Retro-Fragments: Dissection of Critical Structure-Activity Relationships, *PLoS One*. 9 (2014) e110291.
- [260] F.N.N. Akladios, S.D.D. Andrew, C.J.J. Parkinson, Improved cytotoxicity of pyridyl-substituted thiosemicarbazones against MCF-7 when used as metal ionophores, *BioMetals*. 29 (2016) 157–170.
- [261] F.N. Akladios, S.D. Andrew, C.J. Parkinson, Investigation of the cytotoxic implications of metal chelators against melanoma and approaches to improve the cytotoxicity profiles of metal coordinating agents, *BioMetals*. 29 (2016) 789–805.
- [262] F.N. Akladios, S.D. Andrew, C.J. Parkinson, Selective induction of oxidative stress in cancer cells via synergistic combinations of agents targeting redox homeostasis, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 3097–3104.
- [263] J. Shao, A Ferrous-triapipe complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase, *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 586–592.

- [264] J.M. Myers, W.E. Antholine, J. Zielonka, C.R. Myers, The iron-chelating drug triapine causes pronounced mitochondrial thiol redox stress, *Toxicol. Lett.* 201 (2011) 130–136.
- [265] T.B. Chaston, D.B. Lovejoy, R.N. Watts, D.R. Richardson, Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: Multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 402–414.
- [266] R.A. Finch, M.C. Liu, S.P. Grill, W.C. Rose, R. Loomis, K.M. Vasquez, Y. Cheng, A.C. Sartorelli, Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 983–991.
- [267] A.J. Ocean, P. Christos, J.A. Sparano, D. Matulich, A. Kaubish, A. Siegel, M. Sung, M.M. Ward, N. Hamel, I.Espinoza-Delgado, Y. Yen, M.E. Lane, Phase II trial of the ribonucleotide reductase inhibitor 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone plus gemcitabine in patients with advanced biliary tract cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68 (2011) 379–388.
- [268] C.M. Nutting, C.M.L. van Herpen, A.B. Miah, S.A. Bhide, J.-P. Machiels, J. Buter, C. Kelly, D. de Raucourt, K.J. Harrington. Phase II study of 3-AP Triapine in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma., *Ann. Oncol.* 20 (2009) 1275–1279.
- [269] P.J. Jansson, D.S. Kalinowski, D.J.R. Lane, Z. Kovacevic, N.A. Seebacher, L. Fouani, S. Sahni, A.M. Merlot, D.R. Richardson, The renaissance of polypharmacology in the development of anti-cancer therapeutics: Inhibition of the “triad of Death” in cancer by Di-2-pyridylketone thiosemicarbazones, *Pharmacol. Res.* 100 (2015) 255–260.
- [270] N.A. Seebacher, D.R. Richardson, P.J. Jansson, Glucose modulation induces reactive oxygen species and increases P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to chemotherapeutics, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 2557–2572.
- [271] D.B. Lovejoy, P.J. Jansson, U.T. Brunk, J. Wong, P. Ponka, D.R. Richardson, Antitumor activity of metal-chelating compound Dp44mT is mediated by formation of a redox-active copper complex that accumulates in lysosomes, *Cancer Res.* 71 (2011) 5871–5880.

- [272] D.J.R. Lane, A.M. Merlot, M.L.H. Huang, D.H. Bae, P.J. Jansson, S. Sahni, D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853 (2015) 1130–1144.
- [273] E. Noolsri, D.R. Richardson, S. Lerdwana, S. Fucharoen, T. Yamagishi, D.S. Kalinowski, K. Pattanapanyasat, Antitumor activity and mechanism of action of the iron chelator, Dp44mT, against leukemic cells, *Am. J. Hematol.* 84 (2009) 170–176.
- [274] V.A. Rao, S.R. Klein, K.K. Agama, E. Toyoda, N. Adachi, Y. Pommier, E.B. Shacter, The iron chelator Dp44mT causes DNA damage and selective inhibition of topoisomerase IIA in breast cancer cells, *Cancer Res.* 69 (2009) 948–957.
- [275] M. Whitnall, J. Howard, P. Ponka, D.R. Richardson, A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 14901–14906.
- [276] D.B. Lovejoy, D.M. Sharp, N. Seebacher, P. Obeidy, T. Prichard, C. Stefani, M.T. Basha, P.C. Sharpe, P.J. Jansson, D.S. Kalinowski, P.V. Bernhardt, D.R. Richardson, Novel second-generation Di-2-pyridylketone thiosemicarbazones show synergism with standard chemotherapeutics and demonstrate potent activity against lung cancer xenografts after oral and intravenous administration in vivo, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 7230–7244.
- [277] V. Prachayasittikul, S. Prachayasittikul, S. Ruchirawat, V. Prachayasittikul, 8-Hydroxyquinolines: A review of their metal chelating properties and medicinal applications, *Drug Des. Devel. Ther.* 7 (2013) 1157–1178.
- [278] H. Jiang, J.E. Taggart, X. Zhang, D.M. Benbrook, S.E. Lind, W.Q. Ding, Nitroxoline (8-hydroxy-5-nitroquinoline) is more a potent anti-cancer agent than clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-quinoline), *Cancer Lett.* 312 (2011) 11–17.
- [279] G. Pastuch-Gawolek, K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Musioł, M. Serda, B. Czaplinska, R. Musiol, Small molecule glycoconjugates with anticancer activity, *Eur. J. Med. Chem.* 112 (2016) 130–144.
- [280] A. Martirosyan, Actions of a Histone Deacetylase Inhibitor NSC3852 (5-Nitroso-8-quinolinol) Link Reactive Oxygen Species to Cell Differentiation and Apoptosis in

- MCF-7 Human Mammary Tumor Cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317 (2006) 546–552.
- [281] W.-Q. Ding, B. Liu, J.L. Vaught, H. Yamauchi, S.E. Lind, Anticancer Activity of the Antibiotic Clioquinol Anticancer Activity of the Antibiotic Clioquinol, *Cancer Res.* 65 (2005) 3389–3395.
- [282] S. Madonna, C. Béclin, Y. Laras, V. Moret, A. Marcowycz, D. Lamoral-Theys, J. Dubois, M. Barthelemy-Requin, G. Lenglet, S. Depauw, T. Cresteil, G. Aubert, V. Monnier, R. Kiss, M.H. David-Cordonnier, J.L. Kraus, Structure-activity relationships and mechanism of action of antitumor bis 8-hydroxyquinoline substituted benzylamines, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 623–638.
- [283] J.A. Cowan, Chemical nucleases, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 634–642.
- [284] M. Serda, D.S. Kalinowski, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musiol, A. Szurko, A. Ratuszna, N. Pantarat, Z. Kovacevic, A.M. Merlot, D.R. Richardson, J. Polanski, Synthesis and characterization of quinoline-based thiosemicarbazones and correlation of cellular iron-binding efficacy to anti-tumor efficacy, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 5527–5531.
- [285] M. Serda, Synteza i aktywność biologiczna nowych analogów tosemikarbazonowych chelatorów żelaza, 2013.
- [286] M. Prutki, M. Poljak-Blazi, M. Jakopovic, D. Tomas, I. Stipancic, N. Zarkovic, Altered iron metabolism, transferrin receptor 1 and ferritin in patients with colon cancer, *Cancer Lett.* 238 (2006) 188–196.
- [287] S. V Torti, F.M. Torti, Cellular iron metabolism in prognosis and therapy of breast cancer., *Crit. Rev. Oncog.* 18 (2013) 435–48.
- [288] Z.K. Pinnix, L.D. Miller, W. Wang, R. D’Agostino, T. Kute, M.C. Willingham, H. Hatcher, L. Tesfay, G. Sui, X. Di, S.V. Torti, F.M. Torti, Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis., *Sci. Transl. Med.* 2 (2010) 43ra56.
- [289] A. Omuro, Glioblastoma and Other Malignant Gliomas, *Jama.* 310 (2013) 1842.
- [290] M. Brázdová, T. Quante, L. Tögel, K. Walter, C. Loscher, V. Tichý, L. Cincárová, W. Deppert, G.V. Tolstonog, Modulation of gene expression in U251 glioblastoma cells by binding of mutant p53 R273H to intronic and intergenic sequences, *Nucleic Acids Res.*

37 (2009) 1486–1500.

- [291] J. Li, L. Yang, S. Gaur, K. Zhang, X. Wu, Y.C. Yuan, H. Li, S. Hu, Y. Weng, Y. Yen, Mutants TP53 p.R273H and p.R273C but not p.R273G Enhance Cancer Cell Malignancy, *Hum. Mutat.* 35 (2014) 575–584.
- [292] C. Legendre, E. Garcion, Iron metabolism: A double-edged sword in the resistance of glioblastoma to therapies, *Trends Endocrinol. Metab.* 26 (2015) 322–331.
- [293] C. Legendre, S. Avril, C. Guillet, E. Garcion, Low oxygen tension reverses antineoplastic effect of iron chelator deferasirox in human glioblastoma cells, *BMC Cancer.* 16 (2016) 51.
- [294] E.P. Gillis, K.J. Eastman, M.D. Hill, D.J. Donnelly, N.A. Meanwell, Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 8315–8359.
- [295] H.-J. Böhm, D. Banner, S. Bendels, M. Kansy, B. Kuhn, K. Müller, U. Obst-Sander, M. Stahl, Fluorine in medicinal chemistry., *Chembiochem.* 5 (2004) 637–43.
- [296] A. Mrozek-Wilczkiewicz, Poszukiwanie nowych chelatorów żelaza dla terapii przeciwnowotworowych, 2013.
- [297] N. S.H.N. Moorthy, N. M.F.S.A. Cerqueira, M. J. Ramos, P. A. Fernandes, Aryl- and Heteroaryl-Thiosemicarbazone Derivatives and Their Metal Complexes: A Pharmacological Template, *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* 8 (2013) 168–182.
- [298] J. Faist, W. Seebacher, R. Saf, R. Brun, M. Kaiser, R. Weis, New N-methylpiperazinyl derivatives of bicyclic antiprotozoal compounds, *Eur. J. Med. Chem.* 47 (2012) 510–519.
- [299] T. Ochi, M. Sakamoto, A. Minamida, K. Suzuki, T. Ueda, T. Une, H. Toda, K. Matsumoto, Y. Terauchi, Syntheses and properties of the major hydroxy metabolites in humans of blonanserin AD-5423, a novel antipsychotic agent, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 1055–1059.
- [300] D.S. Schiller, H.B. Fung, Posaconazole: An extended-spectrum triazole antifungal agent, *Clin. Ther.* 29 (2007) 1862–1886.
- [301] N. Ae, Y. Fujiwara, Process of a quaternary ammonium salt, US20110263847A1, 2011.

- [302] P.H. Gosselaar, A.J.G. Van-Dijk, G.C. De-Gast, L. Polito, A. Bolognesi, W.C. Vooijs, A.F. Verheul, H.G. Krouwer, J.J. Marx, Transferrin toxin but not transferrin receptor immunotoxin is influenced by free transferrin and iron saturation, *Eur. J. Clin. Invest.* 32 (2002) 61–69.
- [303] S. Wang, E.A. Konorev, S. Kotamraju, J. Joseph, S. Kalivendi, B. Kalyanaraman, Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms: Intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 25535–25543.
- [304] N. S.H.N. Moorthy, N. M.F.S.A. Cerqueira, M. J. Ramos, P. A. Fernandes, Aryl- and Heteroaryl-Thiosemicarbazone Derivatives and Their Metal Complexes: A Pharmacological Template, *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* 8 (2013) 168–182.
- [305] P.J. Jansson, P.C. Sharpe, P. V. Bernhardt, D.R. Richardson, Novel thiosemicarbazones of the ApT and DpT series and their copper complexes: Identification of pronounced redox activity and characterization of their antitumor activity, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 5759–5769.
- [306] G. Haklar, E. Sayin-Ozveri, M. Yuksel, A.O. Aktan, A.S. Yalcin, Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors, *Cancer Lett.* 165 (2001) 219–224.
- [307] C.R.R. Kowol, R. Trondl, P. Heffeter, V.B.B. Arion, M.A.A. Jakupec, A. Roller, M. Galanski, W. Berger, B.K. Keppler, Impact of metal coordination on cytotoxicity of 3-aminopyridine-2- carboxaldehyde thiosemicarbazone (Triapine) and novel insights into terminal dimethylation, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 5032–5043.
- [308] X.P. Jiang, F. Wang, D.C. Yang, R.L. Elliott, J.F. Head, Induction of apoptosis by iron depletion in the human breast cancer MCF-7 cell line and the 13762NF rat mammary adenocarcinoma in vivo, *Anticancer Res.* 22 (2002) 2685–2692.
- [309] M.P. Bolloskis, F.P. Carvalho, G. Loo, Iron depletion in HCT116 cells diminishes the upregulatory effect of phenethyl isothiocyanate on heme oxygenase-1, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 297 (2016) 22–31.
- [310] V.F. Chekhun, N.Y. Lukyanova, A.P. Burlaka, N.A. Bezdenezhnykh, S.I. Shpileva, V.P. Tryndyak, F.A. Beland, I.P. Pogribny, Iron metabolism disturbances in the MCF-7

- human breast cancer cells with acquired resistance to doxorubicin and cisplatin, *Int. J. Oncol.* 43 (2013) 1481–1486.
- [311] J.J. Lu, S.M. Chen, X.W. Zhang, J. Ding, L.H. Meng, The anti-cancer activity of dihydroartemisinin is associated with induction of iron-dependent endoplasmic reticulum stress in colorectal carcinoma HCT116 cells, *Invest. New Drugs.* 29 (2011) 1276–1283.
- [312] I. Rahman, A. Kode, S.K. Biswas, Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method, *Nat. Protoc.* 1 (2007) 3159–3165.
- [313] J.S. Armstrong, K.K. Steinauer, B. Hornung, J.M. Irish, P. Lecane, G.W. Birrell, D.M. Peehl, S.J. Knox, Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line, *Cell Death Differ.* 9 (2002) 252–263.
- [314] S.P. Hussain, P. Amstad, P. He, A. Robles, S. Lupold, I. Kaneko, M. Ichimiya, S. Sengupta, L. Mechanic, S. Okamura, L.J. Hofseth, M. Moake, M. Nagashima, K.S. Forrester, C.C. Harris, p53-Induced Up-Regulation of MnSOD and GPx but not Catalase Increases Oxidative Stress and Apoptosis, *Cancer Res.* 64 (2004) 2350–2356.
- [315] G. Valdameri, M. Trombetta-Lima, P.R. Worfel, A.R.A. Pires, G.R. Martinez, G.R. Noleto, S.M. Cadena, M.C. Sogayar, S.M. Winnischofer, M.E. Rocha, Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells, *Chem. Biol. Interact.* 193 (2011) 180–189.
- [316] K. Salnikow, O. Aprelikova, S. Ivanov, S. Tackett, M. Kaczmarek, A. Karaczyn, H. Yee, K.S. Kasprzak, J. Niederhuber, Regulation of hypoxia-inducible genes by ETS1 transcription factor, *Carcinogenesis.* 29 (2008) 1493–1499.
- [317] D.J.R. Lane, F. Saletta, Y.S. Rahmanto, Z. Kovacevic, D.R. Richardson, Correction: N-myc Downstream Regulated 1 (NDRG1) is regulated by eukaryotic initiation factor 3a (eIF3a) during cellular stress caused by iron depletion, *PLoS One.* 11 (2016) 1–15.
- [318] Z. Kovacevic, D.R. Richardson, The metastasis suppressor, Ndr-1: A new ally in the fight against cancer, *Carcinogenesis.* 27 (2006) 2355–2366.

- [319] S.K. Kurdistani, P. Arizti, C.L. Reimer, M.M. Sugrue, S.A. Aaronson, S.W. Lee, Inhibition of tumor cell growth by RTP/rit42 and its responsiveness to p53 and DNA damage, *Cancer Res.* 58 (1998) 4439–4444.
- [320] J.X. Huo, S. a Metz, G.D. Li, p53-independent induction of p21(waf1/cip1) contributes to the activation of caspases in GTP-depletion-induced apoptosis of insulin-secreting cells., *Cell Death Differ.* 11 (2004) 99–109.
- [321] T. Russo, N. Zambrano, F. Esposito, R. Ammendola, F. Cimino, M. Fiscella, J. Jackman, P.M. O'Connor, C.W. Anderson, E. Appella, A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 29386–29391.
- [322] D. Candas, M. Fan, D. Nantajit, A.T. Vaughan, J.S. Murley, G.E. Woloschak, D.J. Grdina, J.J. Li, CyclinB1/Cdk1 phosphorylates mitochondrial antioxidant MnSOD in cell adaptive response to radiation stress, *J. Mol. Cell Biol.* 5 (2013) 166–175.
- [323] J.A. Ubersax, E.L. Woodbury, P.N. Quang, M. Paraz, J.D. Blethrow, K. Shah, K.M. Shokat, D.O. Morgan, Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1, *Nature.* 425 (2003) 859–864.
- [324] H.J. Choi, M. Fukui, B.T. Zhu, Role of cyclin B1/Cdc2 up-regulation in the development of mitotic prometaphase arrest in human breast cancer cells treated with nocodazole, *PLoS One.* 6 (2011) e24312.
- [325] C.H. Topham, S.S. Taylor, Mitosis and apoptosis: How is the balance set?, *Curr. Opin. Cell Biol.* 25 (2013) 780–785.
- [326] W. Tao, The mitotic checkpoint in cancer therapy., *Cell Cycle.* 4 (2005) 1495–1499.
- [327] M.C. Willingham, Cytochemical methods for the detection of apoptosis, *J Histochem Cytochem.* 47 (1999) 1101–1110.
- [328] Saswati, A. Chakraborty, S.P. Dash, A.K. Panda, R. Acharyya, A. Biswas, S. Mukhopadhyay, S.K. Bhutia, A. Crochet, Y.P. Patil, M. Nethaji, R. Dinda, Synthesis, X-ray structure and in vitro cytotoxicity studies of Cu(I/II) complexes of thiosemicarbazone: special emphasis on their interactions with DNA., *Dalton Trans.* 44 (2015) 6140–57.

- [329] T. Bal-Demirci, G. Congur, A. Erdem, S. Erdem-Kuruca, N. Özdemir, K. Akgün-Dar, B. Varolf, B. Ülküsevena, Iron(III) and nickel(ii) complexes as potential anticancer agents: Synthesis, physicochemical and structural properties, cytotoxic activity and DNA interactions, *New J. Chem.* 39 (2015) 5643–5653.
- [330] J.T. Wilson, X. Jiang, B.C. McGill, E.C. Lisic, J.E. Deweese, Examination of the Impact of Copper(II) α -(N)-Heterocyclic Thiosemicarbazone Complexes on DNA Topoisomerase II α , *Chem. Res. Toxicol.* 29 (2016) 649–658.
- [331] A. Mrozek-Wilczkiewicz, E. Spaczynska, K. Malarz, W. Cieslik, M. Rams-Baron, V. Kryštof, R. Musiol, Design, synthesis and in Vitro activity of anticancer styrylquinolines. The p53 independent mechanism of action, *PLoS One.* 10 (2015) 10–13.
- [332] V.A. Rao, Iron Chelators with Topoisomerase-Inhibitory Activity and Their Anticancer Applications, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 930–955.
- [333] R. Palchaudhuri, P.J. Hergenrother, DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action, *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 497–503.
- [334] M. Airoidi, G. Barone, G. Gennaro, A.M. Giuliani, M. Giustini, Interaction of doxorubicin with polynucleotides. a spectroscopic study, *Biochemistry.* 53 (2014) 2197–2207.
- [335] J.K. Barton, A.T. Danishefsky, J.M. Goldberg, Tris(phenanthroline)ruthenium(II): Stereoselectivity in Binding to DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 2172–2176.
- [336] Z. Xu, Y. Liu, S. Zhou, Y. Fu, C. Li, Analysis of the Interaction of Dp44mT with Human Serum Albumin and Calf Thymus DNA Using Molecular Docking and Spectroscopic Techniques, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 1042.
- [337] H.C. Becker, B. Nordén, DNA binding mode and sequence specificity of piperazinylcarbonyloxyethyl derivatives of anthracene and pyrene, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 11947–11952.
- [338] J.C. Yalowich, X. Wu, R. Zhang, R. Kanagasabai, M. Hornbaker, B.B. Hasinoff, The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase II α , *Biochem. Pharmacol.* 84 (2012) 52–

- [339] D.X. West, A.E. Liberta, K.G. Rajendran, I.H. Hall, The cytotoxicity of copper(II) complexes of heterocyclic thiosemicarbazones and 2-substituted pyridine N-oxides, *Anticancer. Drugs*. 4 (1993) 241–249.
- [340] D.E.J.G.J. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev. Cancer*. 3 (2003) 380–387.
- [341] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbely, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 889–905.
- [342] M. MacCormack, Photodynamic Therapy, *Adv. Dermatol.* 22 (2006) 219–258.
- [343] P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S.M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbely, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab, Photodynamic therapy of cancer: An update, *CA. Cancer J. Clin.* 61 (2011) 250–281.
- [344] R.B. Mokhtari, T.S. Homayouni, N. Baluch, E. Morgatskaya, S. Kumar, B. Das, H. Yegeret, Combination therapy in combating cancer, *Oncotarget*. 8 (2017) 38022–38043.
- [345] B. He, C. Lu, G. Zheng, X. He, M. Wang, G. Chen, G. Zhang, A. Lu, Combination therapeutics in complex diseases, *J. Cell. Mol. Med.* 20 (2016) 2231–2240.
- [346] N.L. Komarova, C.R. Boland, Cancer: Calculated treatment, *Nature*. 499 (2013) 291–292.
- [347] A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Serda, R. Musiol, G. Malecki, A. Szurko, A. Muchowicz, J. Golab, A. Ratuszna, J. Polanski, Iron chelators in photodynamic therapy revisited: Synergistic effect by novel highly active thiosemicarbazones, *ACS Med. Chem. Lett.* 5 (2014) 336–339.
- [348] R.R. Allison, G.H. Downie, R. Cuenca, X.-H. Hu, C.J. Childs, C.H. Sibata, Photosensitizers in clinical PDT, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 1 (2004) 27–42.
- [349] A.R. Battersby, Tetrapyrroles: the pigments of life, *Nat. Prod. Rep.* 17 (2000) 507–26.
- [350] D. Bauer, F.-P. Montforts, A. Losi, H. Görner, Photoprocesses of chlorin e6 glucose derivatives, *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (2012) 925.

- [351] R.R. Allison, C.H. Sibata, Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 7 (2010) 61–75.
- [352] M.J. Garland, C.M. Cassidy, D. Woolfson, R.F. Donnelly, Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments, *Future Med. Chem.* 1 (2009) 667–691.
- [353] K.J. Lorenz, H. Maier, Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich, *HNO.* 56 (2008) 402–409.
- [354] R. Musiol, A. Mrozek-Wilczkiewicz, J. Polanski, Synergy Against Fungal Pathogens: Working Together is Better Than Working Alone., *Curr. Med. Chem.* 21 (2014) 870–93.
- [355] T.C. Chou, P. Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Adv. Enzyme Regul.* 22 (1984) 27–55.
- [356] T.-C. Chou, Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies, *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 621–681.
- [357] T.C.T.-C. Chou, Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method, *Cancer Res.* 70 (2010) 440–446.
- [358] G. Link, A.M. Konijn, C. Hershko, Cardioprotective effect of α -tocopherol, ascorbate, deferoxamine, and deferiprone: Mitochondrial function in cultured, iron-loaded heart cells, *J. Lab. Clin. Med.* 133 (1999) 179–188.
- [359] R. Trondl, L.S. Flocke, C.R. Kowol, P. Heffeter, U. Jungwirth, G.E. Mair, R. Steinborn, E.A. Enyedy, M.A. Jakupiec, W. Berger, B.K. Keppler, Triapine and a More Potent Dimethyl Derivative Induce Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer Cells, *Mol. Pharmacol.* 85 (2014) 451–459.
- [360] H.-I. Hung, J.M. Schwartz, E.N. Maldonado, J.J. Lemasters, A.-L. Nieminen, Mitoferrin-2-dependent mitochondrial iron uptake sensitizes human head and neck squamous carcinoma cells to photodynamic therapy., *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 677–86.
- [361] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis*

Photodyn. Ther. 1 (2004) 279–293.

- [362] M.R. Detty, S.L. Gibson, S.J. Wagner, Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 3897–3915.
- [363] Y.W. Chen, L. Li, M.H. Zhang, T. Shen, An explanation to the high efficiency of m-THPC (temporfin) used in photodynamic therapy, *Chinese Sci. Bull.* 46 (2001) 823–827.
- [364] J. Saczko, J. Kulbacka, A. Chwilkowska, A. Pola, M. Lugowski, A. Marcinkowska, A. Malarska, T. Banas. Cytosolic superoxide dismutase activity after photodynamic therapy, intracellular distribution of Photofrin II and hypericin, and P-glycoprotein localization in human colon adenocarcinoma, *Folia Histochem. Cytobiol.* 45 (2007) 93–97.
- [365] H. Piotrowska, M. Kucinska, M. Murias, Expression of CYP1A1, CYP1B1 and MnSOD in a panel of human cancer cell lines, *Mol. Cell. Biochem.* 383 (2013) 95–102.
- [366] S.K. Dhar, D.K. St. Clair, Manganese superoxide dismutase regulation and cancer, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 2209–2222.
- [367] J.Y. Min, S.O. Lim, G. Jung, Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter, *FEBS Lett.* 584 (2010) 2427–2432.
- [368] A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles, Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014 (2014) 31.
- [369] G. Barrera, Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy, *ISRN Oncol.* 2012 (2012) 1–21.
- [370] H. Yu, P. Guo, X. Xie, Y. Wang, G. Chen, Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases, *J. Cell. Mol. Med.* 21 (2017) 648–657.
- [371] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, *Methods.* 25 (2001) 402–408.

VII. CURRICULUM VITAE

Katarzyna Malarz

Data urodzenia: 28.09.1989

Tel: 784 581 380

email: kmalarz@us.edu.pl



Wykształcenie:

- | | |
|-------------|---|
| 2013 - 2017 | Uniwersytet Śląski, Wydział Matematyki Fizyki i Chemii, Instytut Chemii, studia doktoranckie, kierunek chemia |
| 2011 - 2013 | Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, studia II stopnia - magisterskie, kierunek biotechnologia. Praca magisterska realizowana w Zakładzie Biologii Komórki. |
| 2008 - 2011 | Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, studia I stopnia - licencjackie, kierunek biotechnologia. Praca licencjacka realizowana w Katedrze Biochemii. |

Doświadczenie:

- | | |
|------------------|---|
| VII-VIII 2016 | Technik w Katedrze Biologii Komórki na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego |
| X 2014 - II 2015 | Staż naukowy na Wydziale Farmaceutycznym, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic, pod opieką prof. Josefa Jampilka |

Osiągnięcia:

- **Kierownik grantu** Preludium 12 finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki: "Spojrzenie na aktywność biologiczną i mechanizm działania nowych pochodnych styrylochinazoliny, jako inhibitorów kinaz tyrozynowych", nr rej. **2016/23/N/N27/00351** (okres realizacji grantu 29.09.2017-28.09.2019)

- Udział (w charakterze **głównego wykonawcy**) w projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki: "Aktywność przeciwnowotworowa pochodnych tiosemikarbazonu", nr rej. **2014/13/D/NZ7/00322**
- Udział (w charakterze **wykonawcy**) w projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki: "Głębsze spojrzenie na spektrum aktywności styrylochinolin", nr rej. **2013/09/B/NZ7/00423**
- Certificate in photobiology from European Society for Photobiology - 4th ESP Photobiology School (19-25 czerwca 2016 - Brixen/Bressanone)

Publikacje:

1. Spaczynska E., Tabak D., Malarz K., Musiol R.; "Investigation of the spectrum of applicability of quinoline amides" *Der Pharma Chemica* **2014**, 6(6), 233-240. IF=0,48
2. Cieslik W., Spaczynska E., Malarz K., Tabak D., Nevin E., O'Mahony J., Coffey A., Mrozek-Wilczkiewicz A., Jampilek J., Musiol R.; "Investigation of the Antimycobacterial Activity of 8-Hydroxyquinolines" *Medicinal Chemistry* **2015**, 11(8), 771-779. IF=1,423; MNiSW=20
3. Mrozek-Wilczkiewicz A., Spaczynska E.*, Malarz K.*, Cieslik W.*, Rams-Baron M., Kristof V., Musiol R.; "Design, synthesis and in vitro activity of anticancer styrylquinolines. The p53 independent mechanism of action" *Plos ONE* **2015** Nov 23; 10(11): e0142678. IF=3,535; MNiSW=40
4. Pastuch-Gawolek G.*, Malarz K.*, Mrozek-Wilczkiewicz A., Musiol M., Serda M., Czaplinska B., Musiol R.; „Small molecule glycoconjugates with anticancer activity” *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 112, 130-144. IF=3,982; MNiSW=40
5. Łączkowski K.Z., Świtalska M., Baranowska-Łączkowska A., Plech T., Paneth A., Misiura K., Wietrzyk J., Czaplinska B., Mrozek-Wilczkiewicz A., Malarz K., Musiol R., Grela I.; „Thiazole-based nitrogen mustards: Design, synthesis, spectroscopic studies, DFT calculation, molecular docking, and antiproliferative activity against selected human cancer cell lines”, *Journal of Molecular Structure* **2016**, 1119, 139–150. IF=1,683; MNiSW=20
6. Sala K.*, Malarz K.*, Barlow P.W., Kurczyńska E.U.; „Distribution of some pectic and arabinogalactan protein epitopes during *Solanum lycopersicum* (L.) adventitious root development”, *BMC Plant Journal* **2017**, 17, 25. IF=4,714; MNiSW=40
7. Musiol R., Malarz K., Mularski J.; „Quinoline Alkaloids Against Neglected Tropical Diseases”, *Current Organic Chemistry* **2017**, 21, 1-11. doi:10.2174/1385272821666170207103634. IF= 2,157; MNiSW=35

8. Mrozek-Wilczkiewicz A., Malarz K., Rams-Baron M., Serda M., Bauer D., Montforts F.-P., Ratuszna A., Burley T., Polanski J., Musiol R.; „Iron chelators and exogenic photosensitizers. Synergy through oxidative stress gene expression”, *Journal of Cancer* **2017**, 8, 1979–87. doi: 10.7150/jca.17959. IF=3,609; MNiSW=30
9. Peszke J., Dulski M., Nowak A., Balin K., Zubko M., Sułowicz S., Nowak B., Piotrowska-Seget Z., Talik E., Wojtyniak M., Mrozek-Wilczkiewicz A., Malarz K., Szade J. ; „Unique properties of silver and copper silica-based nanocomposites as antimicrobial agents”, *RSC Advances* **2017**, 7, 28092–28104. IF=3,289; MNiSW=35
10. Czaplińska B., Maron A., Malecki J.G., Szafraniec-Gorol G., Matussek M., Malarz K., Mrozek-Wilczkiewicz A., Danikiewicz W., Musiol R., Slodek A.; „Comprehensive exploration of the optical and biological properties of new quinolines based cellular probes”, *Dyes and Pigments* **2017**, 144, 119-132. IF=4,055; MNiSW=40
11. Musiał M., Malarz K., Mrozek-Wilczkiewicz A., Musiol R., Zorebski E., Dzida M.; „Pyrrolidinium-based ionic liquids as sustainable media in heat transfer processes”, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2017**, DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b02918. IF=5,951; MNiSW=40
12. Rejmund R., Mrozek-Wilczkiewicz A., Malarz K., Pyrkosz-Bulska M., Gajcy K., Sajewicz M., Musiol R., Polanski J.; „Piperazinyl fragment improves anticancer activity of Triapine”, *Plos ONE* **2017** in print. IF=2,806; MNiSW=35

Indeks Hirsha - 2 (3 wg. Google Scholar)

Sumaryczny impact factor - 37,684

Liczba cytowań - 13 (20 wg. Google Scholar)

Zgłoszenia patentowe:

1. Musioł R., Mrozek-Wilczkiewicz A., Spaczyńska E., Malarz K., Rams-Baron M., Cieślík W., Szurko A., „Zastosowanie pochodnych styrylochinoliny do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia nowotworów jelita grubego”, 2015, **P.407379**
2. Mrozek-Wilczkiewicz A., Malarz K., Musioł R., Czaplińska B., „Nowa pochodna styrylochinoliny oraz jej zastosowanie”, 2016, **P.419316**
3. Mrozek-Wilczkiewicz A., Malarz K., Musioł R., Czaplińska B., „Nowe zastosowanie pochodnych para-iminostyrylochinoliny”, 2016, **P.419317**
4. Mrozek-Wilczkiewicz A., Malarz K., Musioł R., Spaczyńska E., Krzykała K., Jampilek J., „Nowe pochodne naftalenu oraz ich zastosowanie”, 2016, **P.419318**

5. Mrozek-Wilczkiewicz A., Malarz K., Musioł R., Serda M., „Kompozycja farmaceutyczna pochodnej karbotiohydrazdu i jej zastosowanie”, 2016, **P.419319**
6. Mrozek-Wilczkiewicz A., Malarz K., Musioł R., Czaplińska B., „Nowa pochodna para-aminostyrylochinoliny oraz jej zastosowanie”, 2016, **P.419320**
7. Czaplińska B., Malarz K., Mrozek-Wilczkiewicz A., Musioł R., „Nowa pochodna styrylochinoliny oraz jej zastosowanie”, 2017, **P.420283**
8. Polański J., Rejmund M., Gajcy K., Pyrkosz-Bulska M., Mrozek-Wilczkiewicz A., Malarz K., Musioł R., „Nowe pochodne Triapiny, sposób ich otrzymywania oraz ich zastosowanie”, 2017, **P. 421488**
9. Mularski J., Malarz K., Musioł R., „Pochodne chinazoliny i ich zastosowanie”, 2017, **P.421716**
10. Mularski J., Malarz K., Musioł R., „Pochodne styrylochinazolinonu i ich zastosowanie”, 2017, **P.421717**
11. Jampílek J., Goněc T., Musioł R., Spaczyńska E., Malarz K., Mrozek-Wilczkiewicz A., Kapustíková I., “Utilization of New Antitumoral Naphthalene Derivatives Effective in Treatment of Colon Cancer”, July 17, 2017, Slovak Patent; application **PP 64-2017**

Prezentacje ustne na konferencjach naukowych = 7

Postery naukowe na konferencjach krajowych oraz międzynarodowych = 13

Znajomość języków obcych:

Język angielski - dobry

Język niemiecki - podstawowy

Zainteresowania:

Biologia molekularna

Sport: wioślarstwo (sukcesy: II i III miejsce na Akademickich Mistrzostwach Śląska w ergometrze wioślarski, kategoria: normalna), kolarstwo, turystyka górską

Muzyka – progresywny rock; gra na gitarze basowej.

Gry planszowe